

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЛОЙ ГАЛИНА ЯРОСЛАВІВНА

УДК 615.272.3/.349.7:615.015.4-06:616.379-008.64-06:616-001.8-008.9]-092.9

ДИСЕРТАЦІЯ
КАРДІОПРОТЕКТИВНІ ЕФЕКТИ ПРЕПАРАТУ МЕТФОРМІН ПРИ
ГІПОКСІЇ ТА МЕТАБОЛІЧНОМУ СТРЕСІ

222 – Медицина

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Лой Г.Я.

Наукові керівники: **Олещук Олександра Михайлівна**, доктор медичних наук, професор; **Кундузова Оксана**, PhD.

Тернопіль – 2020

АНОТАЦІЯ

Лой Г.Я. Кардіопротективні ефекти препарату метформін при гіпоксії та метаболічному стресі. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (22 Охорона здоров'я) – Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, 2020.

Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2020.

Дисертація присвячена з'ясуванню механізмів кардіопротективної дії метформіну за різних патологічних станів, зокрема, при гіпоксії, метаболічному стресі, гіпоксії-реоксигенації, ішемії-реперфузії, ізопротеренол-індукованому ураженні міокарда.

Встановлено, що метформін проявляє виражені кардіопротективні властивості *in vitro* на культурі кардіоміобластів ембріонів щурів (H9C2 клітинах) при гіпоксії та метаболічному стресі. З метою індукції метаболічного стресу кардіоміобласти інкубували упродовж 24 год у живильному середовищі (DMEM) без сироватки із додаванням 2-деокси-d-глюкози у кінцевій молярній концентрації 2 ммоль/л. Гіпоксичний стрес зумовлений інкубацією клітин у гіпоксичному боксі (1 % O₂) упродовж 24 год. Введення метформіну у кінцевій молярній концентрації 5 ммоль/л здійснено за 30 хв до стресу.

Метформін достовірно запобігає гіпертрофії кардіоміобластів в умовах метаболічного стресу і гіпоксії. Площа H9C2 клітин, яким введено метформін в умовах метаболічного стресу, становить $(1238 \pm 20,74)$ мкм² і є достовірно меншою, як порівняти з клітинами, яким корекцію не проведено – $(2494 \pm 47,43)$ мкм². Використання досліджуваного препарату запобігає надмірному росту клітин, зумовленому гіпоксією, їх площа – $(1459 \pm 13,42)$ мкм² проти $(2880 \pm 46,14)$ мкм² у групі клітин, які культивувалися за умов нестачі кисню без введення метформіну, $p < 0,001$.

Метформін захищає Н9С2 клітини від програмованої загибелі. Як в умовах метаболічного стресу, так і при гіпоксії кількість апоптичних клітин різко зростає, порівняно із групами контролю: у 8 і 5,5 разів, відповідно. Частка апоптичних клітин склала $(1,09 \pm 0,24)$ % у групі кардіоміобластів, яким індуковано метаболічний стрес та застосовано метформін, проти $(12,88 \pm 1,96)$ % у групі клітин, яким корекцію метаболічних порушень не проведено, $p < 0,001$. Введення метформіну за умов нестачі кисню попереджає апоптоз Н9С2 клітин: їх відносна кількість склала $(3,35 \pm 0,50)$ % проти $(8,54 \pm 0,73)$ % у групі кардіоміобластів, що культивувалися за умов гіпоксії без корекції метформіном, $p < 0,001$.

З'ясовано механізми антигіпертрофічного та антиапоптичного ефектів метформіну у Н9С2 клітинах в умовах гіпоксії-реоксигенації.

При нормальній експресії гена FoxO1 метформін ефективно запобігає гіпертрофії кардіоміобластів: площа клітин при застосуванні метформіну – $(1397 \pm 19,58)$ мкм² і є втричі меншою, ніж в умовах стресу без корекції – $(4333 \pm 123,70)$ мкм², $p < 0,001$. Трансфекція гена за допомогою siРНК FoxO1 нівелює здатність метформіну попереджати збільшення площі кардіоміобластів в умовах гіпоксії-реоксигенації: площа клітин у цій групі – $(7383 \pm 193,0)$ мкм² і є вп'ятеро більша, ніж у групі контролю $(1504 \pm 20,90)$ мкм².

Оскільки нокдаун гена FoxO1 призвів до гіпертрофії Н9С2 клітин в усіх умовах, навіть при нормоксії, це свідчить про те, що нормальне функціонування гена є обов'язковою умовою для підтримки фізіологічних розмірів кардіоміоцитів. Отже, залежності між механізмом антигіпертрофічної дії метформіну та експресією гена FoxO1 не виявлено.

При нормальній експресії гена FoxO1 метформін ефективно запобігає програмованій загибелі кардіоміобластів: відносна кількість апоптичних клітин у цій групі в 3,5 рази менша, ніж у групі кардіоміобластів, яким корекцію стресу не проведено. Проте, нокдаун гена FoxO1 позбавляє метформін здатності попереджати програмовану загибель клітин в умовах гіпоксії-реоксигенації: частка апоптичних клітин у цій групі більш, ніж вп'ятеро,

перевищує чисельність таких у контрольній групі. До того ж блокування гена FoxO1 не викликає достовірного збільшення кількості апоптичних клітин при нормоксії. Це свідчить про те, що механізм антиапоптичної дії метформіну у H9C2 клітинах залежний від експресії гена FoxO1.

Наступна серія експериментів присвячена кардіопротективним ефектам метформіну при ураженні серця внаслідок ішемії-реперфузії у мишей типу C57BL/6. Лікування у дозі 5 мг/кг розпочинали через 15 хв після старту реперфузії та проводили упродовж 14 днів.

Метформін запобігає гіпертрофії кардіоміоцитів, зумовленій ішемією-реперфузією. У серії зрізів міокарда, зафарбованих гематоксиліном-еозином, площа клітин у групі ішемії-реперфузії становить $(782,10 \pm 10,41)$ мкм², а лікування метформіном сприяє їх зменшенню у 1,5 рази – $(523,50 \pm 4,64)$ мкм², $p < 0,001$. У гістологічних препаратах, забарвлених за допомогою WGA, площі кардіоміоцитів у групі лікованих метформіном мишей – $(549,0 \pm 7,89)$ мкм² проти $(981,40 \pm 21,64)$ мкм² у групі нелікованих тварин, $p < 0,001$. Метформін запобігає ап-регуляції гена BNP, зменшуючи рівень експресії його мРНК вдвічі, як порівняти з нелікованими мишами.

Метформін запобігає програмованій загибелі кардіоміоцитів, зумовленій ішемією-реперфузією: відносна кількість апоптичних клітин у зразках від лікованих тварин у 14 разів менша, ніж у групі нелікованих.

Препарат володіє вираженим антифібротичним ефектом. У лікованих метформіном тварин депонування фіброзної тканини в міокарді у 6 разів менше, ніж у групі тварин, яким корекцію після ішемії-реперфузії не проводили, що супроводжується попередженням ап-регуляції прогіпертрофічних генів α SMA та COL3A1.

Метформін зменшує запалення у зоні інфаркту міокарда шляхом запобігання ап-регуляції гена CD68. Гістохімічне дослідження маркера макрофагів CD68 підтвердило, що лікування метформіном після ішемії-реперфузії призводить до зменшення кількості макрофагів у міокарді втричі, порівняно із зразками від нелікованих тварин.

Встановлено, що метформін проявляє кардіопротекцію і при ізопротеренол-індукованому (Iso) пошкодженні серцевого м'яза у щурів з ожирінням. В результаті дієти із підвищеним (45%) вмістом жирів (HFD), що тривала 4 тижні, у тварин достовірно збільшилася маса тіла із $(210,2 \pm 2,9)$ г до $(252,9 \pm 5,6)$ г, $p < 0,001$. Лікування щурів метформіном (М) у дозі 100 мг/кг упродовж наступних 7 днів, протягом яких дієта тривала, попередило подальше зростання маси тіла, спостерігалася динаміка до її зниження: $(250,7 \pm 9,4)$ г проти $(239,3 \pm 9,2)$ г, проте результат недостовірний.

Після 35 днів застосування високожирової дієти у щурів виникла дисліпідемія: загальний холестерол, триацилгліцерол та ЛПНЩ у сироватці крові були достовірно підвищені, а ЛПВЩ – знижені, але різниця виявилася невірогідною. У тварин, пролікованих метформіном, рівень триацилгліцеролу зазнав достовірного зменшення: $(1,61 \pm 0,08)$ ммоль/л у групі HFD проти $(1,14 \pm 0,04)$ ммоль/л у групі HFD+М та $(1,3 \pm 0,04)$ ммоль/л у групі HFD+Iso проти $(0,88 \pm 0,02)$ ммоль/л групі HFD+Iso+М, $p < 0,001$.

У щурів із ураженням міокарду, викликаним шляхом введення ізопротеренолу у дозі 5 мг/кг упродовж 7 днів, метформін проявив кардіопротективний вплив як за умов ожиріння, так і при нормальній масі тіла. Достовірне збільшення розмірів кардіоміоцитів спостерігалася у нелікованих тварин, що отримували ізопротеренол. При тому, у групі тварин з ожирінням середня площа клітин була на 35,74 % більша, ніж у таких із нормальною масою тіла. Гіпертрофія виявлена навіть у щурів із ожирінням, викликаним високожировою дієтою, які не отримували ін'єкцій ізопротеренолу: $(337,0 \pm 5,450)$ мкм² у групі HFD проти $(222,3 \pm 3,85)$ мкм² у контрольній групі, $p < 0,001$.

Лікування метформіном попередило гіпертрофічні зміни у кардіоміоцитах при моделюванні ізопротеренолової кардіоміопатії у щурів як із нормальною масою тіла, так і з ожирінням: $(285,1 \pm 4,25)$ мкм² у групі Iso+М проти $(482,6 \pm 8,78)$ мкм² у групі Iso та $(363,4 \pm 5,36)$ мкм² у групі HFD+Iso+М проти $(655,1 \pm 12,7)$ мкм² у групі HFD+Iso, $p < 0,001$. Однак, метформін не

попередив надмірне збільшення кардіоміоцитів у щурів із ожирінням, що не отримували ін'єкцій ізопротеренолу.

Ізопротеренол провокує зростання концентрації мозкового натрійуретичного пептиду (BNP) у сироватці крові у щурів як з нормальною масою тіла (на 85,5 %), так і з ожирінням (більш, ніж вдвічі). Проте сироватковий рівень BNP у щурів з ожирінням без ізопротеренолової кардіоміопатії не зазнав достовірних змін, хоча гістологічно гіпертрофія була виявлена. Лікування метформіном призвело до зниження концентрації BNP у щурів з ізопротереноловою кардіоміопатією та з ожирінням (вдвічі) або без нього (на 30 %), як порівняти з нелікованими тваринами.

Метформін запобігає накопиченню фіброзної тканини при моделюванні ізопротеренолового ураження міокарда у щурів як із нормальною масою тіла, так і з ожирінням: ($4,54 \pm 0,68$) % у групі Iso+M проти ($20,20 \pm 2,25$) % у групі Iso та ($7,42 \pm 0,73$) % у групі HFD+Iso+M проти ($31,40 \pm 2,31$) % у групі HFD+Iso, $p < 0,001$.

Наукова новизна одержаних результатів. В результаті проведених досліджень встановлено, що метформін проявляє виражені кардіопротективні ефекти в умовах гіпоксії та метаболічного стресу. Експериментально *in vitro* та *in vivo* відтворено основні моделі ураження міокарда, що найчастіше виникають при цукровому діабеті, а саме: метаболічний стрес, гіпоксія, ішемія із наступною реперфузією і надмірний тонус симпатичної нервової системи.

Вперше описано FoxO1-залежний механізм антиапоптичної дії метформіну в H9C2 клітинах, на що отримано патент на винахід (Патент України № 120567). Встановлено, що інгібування експресії гена призводить до втрати препаратом можливості захищати кардіоміобласти від гіпоксії-реоксигенації. Зв'язку між експресією гена FoxO1 та антигіпертрофічним ефектом препарату не виявлено. Однак, при трансфекції гена FoxO1 виникає гіпертрофія усіх клітин, навіть тих, які культивувалися в умовах нормоксії, тому наші дослідження підтверджують, що він відіграє важливу роль у підтримці нормальних розмірів клітин.

Досліджено кардіопротективний вплив метформіну на моделі серцевої ішемії-реперфузії у мишей. Встановлено, що введення препарату через 15 хв від початку реперфузії і упродовж наступних 13 днів запобігає ремоделюванню міокарда та репрограмуванню фетальних генів, зменшуючи гіпертрофію, апоптоз, запалення і фіброз. Зокрема, метформін попереджає ап-регуляцію генів BNP, α SMA, COL3A1, CD68, зумовлену ішемією-реперфузією.

Кардіопротективні властивості метформіну підтверджено у щурів із ізопротеренол-індукованим ураженням серця. З'ясовано, що препарат попереджує збільшення маси тіла, зменшує рівень триацилгліцеролу у щурів, які отримували дієту із підвищеним вмістом жирів (45 %) у раціоні, та запобігає гіпертрофічному і фібротичному ремоделюванню міокарда, знижуючи рівень BNP у сироватці крові, як при нормальній масі тіла, так і при ожирінні.

Практичне значення одержаних результатів. Проведені дослідження становлять практичний інтерес для сучасної фармакології, ендокринології та діабетології. Встановлення молекулярних механізмів дії метформіну дозволяє пояснити його нові фармакодинамічні ефекти, розширити спектр показань до застосування цього препарату. Метформін проявляє виражені кардіопротективні властивості в умовах гіпоксії, метаболічних порушень, а також при ішемії-реперфузії та надмірній симпатичній стимуляції. Це обґрунтовує його застосування як препарату, що попереджує розвиток та зменшує прояви основних форм ураження міокарда при цукровому діабеті, та, можливо, як лікарського засобу для лікування захворювань серцевого м'яза недіабетичного генезу. Крім того, з'ясування FoxO1-залежного механізму дії метформіну та його впливу на експресію різноманітних генів дає можливість кращого розуміння фармакодинамічних особливостей та створює перспективи для майбутніх досліджень молекулярних мішеней препарату на шляху реалізації нових і відомих фармакологічних ефектів.

Ключові слова: метформін, гіпертрофія, апоптоз, фіброз, запалення, ремоделювання міокарда.

ANNOTATION

Loi H.Ya. Cardioprotective effects of metformin in hypoxia and metabolic stress. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

PhD thesis, specialty 222 «Medicine» (22 «Health Care»). Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University, 2019.

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, 2020.

The thesis is devoted to the clarification of cardioprotective effects of metformin in various pathological states, particularly, in hypoxia, metabolic stress, hypoxia-reoxygenation, hypoxia-reperfusion, isoproterenol-induced myocardial injury.

Established that metformin exerts significant cardioprotective effects in vitro. Experiments were performed on rat cardiomyoblast cell line (H9C2) under metabolic stress or hypoxia. To induce metabolic stress, H9C2 cells were exposed to 2 mM 2-deoxy-D-glucose (2DG) in 0 % medium for 24 hours. For hypoxic treatment cells were maintained at 37°C under hypoxic atmosphere (1 % O₂) for 24 hours. Cells were treated with 5 mM metformin 30 min before cell stress.

Metformin significantly prevents cardiomyoblasts hypertrophy both in metabolic stress and hypoxia. Metformin prevents cell hypertrophy in the presence of 2DG: cardiomyocytes area is $(1238 \pm 20,74) \mu\text{m}^2$ and is significantly less, as compared to the area of untreated H9C2 cells – $(2494 \pm 47,43) \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$. In the presence of metformin, hypoxia-induced hypertrophy is markedly abolished: H9C2 cells area is $(1459 \pm 13,42) \mu\text{m}^2$, as compared to untreated H9C2 cells $(2880 \pm 46,14) \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$.

Exposure of H9C2 cells for 24 hours either to 2 mM 2DG or to hypoxia induces an increase in apoptotic cells percentage, as compared to control group: 8-fold and 5,5-fold, respectively. Treatment of cardiomyoblasts with metformin is able to attenuate apoptotic cell death, induced by metabolic stress or hypoxia, as compared to untreated cells: $(1,09 \pm 0,24) \%$ against $(12,88 \pm 1,96) \%$, $p < 0,001$, and $(3,35 \pm 0,50) \%$ against $(8,54 \pm 0,73) \%$, $p < 0,001$, respectively.

The pathways involved in exerting antihypertrophic and anti-apoptotic effects of metformin in H9C2 cells under hypoxia-reoxygenation are explored.

In normal FoxO1 gene expression metformin prevents hypertrophic response of cardiomyoblasts, cell area is threefold less, as compared to untreated cells: $(1397 \pm 19,58) \mu\text{m}^2$ against $(4333 \pm 123,70) \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$. Gene transfection with siRNA FoxO1 deprives the ability of metformin to prevent the enlargement of cardiomyoblasts area in hypoxia-reoxygenation: H9C2 areas are 5 times bigger than in control group cells: $(7383 \pm 193,0) \mu\text{m}^2$ against $(1504 \pm 20,90) \mu\text{m}^2$.

But FoxO1 gene silencing results in H9C2 hypertrophy in normoxia: $(2543 \pm 48,82) \mu\text{m}^2$ against $(1504 \pm 20,90) \mu\text{m}^2$ in control group, $p < 0,001$. It means that FoxO1 knockdown provokes cells growth, so normal gene expression is the obligatory condition in maintaining cells sizes. Thus the correlation between antihypertrophic effect of metformin in H9C2 cells and FoxO1 gene expression is not confirmed.

Analysis of TUNEL-stained cells, exposed to hypoxia-reoxygenation, demonstrates that metformin significantly reduces cell apoptosis in control siRNA transfected cells (in 3,5 times) as compared to untreated cells. However, FoxO1 silencing by siRNA abrogates the effects of metformin on H9C2 cell apoptosis: the percentage of TUNEL-positive cells in this group is 5 times bigger as compared to the control group. Besides, the FoxO1 silencing does not enhance apoptotic response in cells, incubated in normoxia, suggesting that anti-apoptotic activity of metformin in H9C2 cells is FoxO1-dependent.

Next we investigated in vivo cardioprotective activity of metformin in a C57BL/6 mouse model of myocardial I/R injury. Treatment with metformin (5 mg/kg, intraperitoneally) was initiated 15 min after the onset of reperfusion and maintained for 14 days.

Metformin prevents I/R induced hypertrophic response in cardiomyocytes. In hematoxylin-eosin stained cardiac sections, cardiomyocytes area after I/R and metformin administration is $(523,50 \pm 4,64) \mu\text{m}^2$, as compared to $(782,10 \pm 10,41) \mu\text{m}^2$ in untreated mice, $p < 0,001$. In WGA stained cardiac sections

cell area after I/R is $(981,40 \pm 21,64) \mu\text{m}^2$, and metformin administration prevents hypertrophic response: cardiomyocytes area is $(549,0 \pm 7,89) \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$. Metformin prevents I/R-induced upregulation of BNP, as compared to untreated mice (in 2 times).

In the group of metformin-treated mice after I/R, it is explored a significant 14-fold decrease in the number of apoptotic cells, when compared to the group of untreated mice.

Metformin exerts a significant anti-fibrotic effect. In cardiac sections stained with Sirius red and fluorescent WGA it is found that metformin reduces cardiac fibrosis after I/R injury in 6 times, as compared to untreated mice. This is further confirmed by measuring the expression levels of the fibrotic markers αSMA and COL3A1 which upregulation is diminished by metformin.

Defined the ability of metformin to abolish inflammation in the infarct area by preventing up-regulation of CD68 gene. Additionally, CD68 immunostaining reveals a 3-fold reduction in inflammatory cell population in cardiac sections from metformin-treated mice, as compared with vehicle-treated animals.

It is established that metformin exerts cardioprotection in isoproterenol-induced (Iso) myocardial injury in obese rats. High-fat diet (HFD), which is fed for 4 weeks, significantly increases body weight from $(210,2 \pm 2,9) \text{ g}$ to $(252,9 \pm 5,6) \text{ g}$, $p < 0,001$. Metformin (M) used at a dose 100 mg/kg during following 7 days of HFD prevents further increase in body weight, tendency to its decrease is observed: $(250,7 \pm 9,4) \text{ g}$ against $(239,3 \pm 9,2) \text{ g}$, but the difference is not significant.

After 35 days of HFD dyslipidemia occurred in rats: total cholesterol, triacylglycerol and LDL cholesterol in the blood serum are significantly increased while lowering of HDL cholesterol is not significant. Treatment with metformin causes significant decrease in triacylglycerol level: $(1,61 \pm 0,08) \text{ mmol/l}$ in HFD group against $(1,14 \pm 0,04) \text{ mmol/l}$ in HFD+M group and $(1,3 \pm 0,04) \text{ mmol/l}$ in HFD+Iso group against $(0,88 \pm 0,02) \text{ mmol/l}$ in HFD+Iso+M group, $p < 0,001$.

In rats with cardiac injury induced by administration of isoproterenol in the dose 5 mg/kg for 7 days, metformin exerts significant cardioprotective effect both in

obesity and normal body weight. Isoproterenol provokes a significant cardiomyocytes hypertrophy in untreated rats. Still in the obese animals average cell area is 35,74 % bigger than in those with normal body weight. Hypertrophy is also detected in the rats with obesity induced by HFD which were not administered isoproterenol: $(337,0 \pm 5,45) \mu\text{m}^2$ against $(222,3 \pm 3,85) \mu\text{m}^2$ in the control group, $p < 0,001$.

Metformin treatment prevents hypertrophic response of cardiomyocytes in the rats with isoproterenol-induced cardiomyopathy and normal body weight or obesity: $(285,1 \pm 4,25) \mu\text{m}^2$ in Iso+M group against $(482,6 \pm 8,78) \mu\text{m}^2$ in Iso group and $(363,4 \pm 5,36) \mu\text{m}^2$ in HFD+Iso+M group against $(655,1 \pm 12,7) \mu\text{m}^2$ in HFD+Iso group, $p < 0,001$. Yet the excess cardiac cells growth in obese rats without isoproterenol administration is not abolished by metformin.

Isoproterenol provokes augmentation of serum BNP level in rats both with normal body weight (in 85,5 %) and obesity (more than twice). But the serum level of BNP in obese mice which are not administered isoproterenol is not significantly changed, although hypertrophy is confirmed histologically. Metformin treatment declines BNP serum concentration in rats with isoproterenol-induced cardiomyopathy and either obesity (2-fold) or normal body weight (in 30 %), as compared to untreated animals.

Metformin treatment prevents fibrotic reprogramming induced by isoproterenol both in rats with normal body weight and obesity: $(4,54 \pm 0,68) \%$ in Iso+M group against $(20,20 \pm 2,25) \%$ in Iso group and $(7,42 \pm 0,73) \%$ in HFD+Iso+M against $(31,40 \pm 2,31) \%$ in HFD+Iso group, $p < 0,001$.

Scientific novelty of the research results. The results of the investigation demonstrate that antidiabetic agent metformin exerts significant cardioprotective effects in hypoxia and metabolic stress. We reconstituted the main models of myocardial injury in vitro and in vivo which develop in diabetes mellitus: diabetic cardiomyopathy, ischemia followed by reperfusion and cardiac autonomic neuropathy with sympathetic overactivity.

Here we first established FoxO1-dependent mechanism of anti-apoptotic action of metformin in cardiomyoblasts. This is confirmed by the fact that FoxO1 gene

knockdown affects anti-apoptotic effects of metformin in H9C2 cells subjected to hypoxia-reoxygenation. Nevertheless, the connection between FoxO1 expression and ability of the drug to reduce hypertrophic response was not found. Despite of this we established that FoxO1 silencing provoked also hypertrophy of the cells which were incubated in normoxia, which demonstrates the significance of the gene in normal cell size maintaining.

Cardioprotective effects of metformin are demonstrated in ischemia-reperfusion injury in mice. It is established that administration of the drug in 15 min after the onset of reperfusion and maintained for 14 days prevented cardiac remodeling, fetal gene reprogramming and abolished hypertrophy, apoptosis, inflammation and fibrosis. Besides, metformin decreased up-regulation of BNP, α SMA, COL3A1 and CD68 genes, induced by ischemia-reperfusion.

The ability of metformin to exert cardioprotection is confirmed in rats with isoproterenol-induced injury of myocardium. It is explored that the drug prevented weight gain and reduced the level of triacylglycerol in rats, fed with high fat diet (45 % of fat), and abolished hypertrophic and fibrotic remodeling of myocardium by decreasing BNP serum level both in normal body weight and obesity.

The practical significance of the attained results. The results of our investigation are of practical interest for modern diabetology, endocrinology, pharmacology and they demonstrate that metformin exerts significant cardioprotective effects in hypoxia, metabolic stress, ischemia-reperfusion and excess sympathetic overactivity. This confirms the metformin's usage as a drug which prevents development and reduces the features of cardiac injury in diabetes mellitus. Besides, establishing of a novel mechanism of metformin action and its impact on genes expression helps to understand better pharmacodynamic particularities of the medicinal agent and produces new perspectives for further investigation of new effects of the drug.

Key words: metformin, hypertrophy, apoptosis, fibrosis, inflammation, cardiac remodeling.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Loi H, Boal F, Tronchere H, Cinato M, Kramar S, Oleshchuk O, et al. Metformin protects the heart against hypertrophic and apoptotic remodeling after myocardial infarction. *Front Pharmacol* [Internet]. 2019;10(154):1-19. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00154/full>. DOI: 10.3389/fphar.2019.00154 (Scopus).
2. Loi HYa, Pavliuk BV, Kramar SB, Korda MM, Oleshchuk OM. Metformin exerts cardioprotection in isoproterenol-induced cardiomyopathy in rats. *Med Clin Chem*. 2019;4:69–77.
3. Лой ГЯ, Олещук ОМ, Корда ММ. Вплив метформіну на експресію α - та β -МНС генів після інфаркту міокарда у мишей. *Вісник наукових досліджень*. 2019(2):90-4.
4. Пасечко НВ, Лой ГЯ, Корда ММ, Олещук ОМ. Роль експресії гена Foxo1 у механізмі антигіпертрофічної дії метформіну в кардіоміоцитах. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2018;14(7):705–11.
5. Лой ГЯ, Олещук ОМ, Корда ММ, винахідники; ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України, патентовласник. Спосіб встановлення механізму антиапоптичної дії метформіну. Патент України № 120567. 2019 Груд 26.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. Лой ГЯ, Олещук ОМ. Вплив метформіну на гіпертрофію H9C2 клітини в умовах метаболічного стресу та гіпоксії. В: Шевчук ОО, редактор. *Матеріали підсумкової LXI наук.-практ. конф. Здобутки клінічної та експериментальної медицини*; 2018 Черв 7; Тернопіль. Тернопіль: ТДМУ; 2018, с. 245.
7. Лой ГЯ, Олещук ОМ. Вплив метформіну на апоптоз H9C2 клітини в умовах метаболічного стресу та гіпоксії. В: Андрейчин СМ, редактор. *Збірник матеріалів Всеукр. наук.-практ. конф. Сучасні аспекти діагностики і лікування*

захворювань внутрішніх органів; 2018 Жовт 11-12; Тернопіль. Тернопіль: ТДМУ; 2018, с. 36.

8. Лой Г.Я. Механізм кардіопротективної дії препарату метформін. В: Корда ММ, редактор. Матеріали XXIII Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2019 Квіт 15-17; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2018, с.36.

9. Лой Г. Влияние метформина на экспрессию каспазы-3 после инфаркта миокарда у мыш. В: Абенова НА, редактор. I международная дистанционная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Future perspectives of science and education»; 2019 Май 16-17; Актобе. Актобе: 2019, с.200–1.

10. Лой Г.Я. Олещук О.М. Метформін запобігає кардіальному ремоделюванню, зумовленому ішемією-реперфузією. В: Олещук ОМ, редактор. Актуальні питання фармакології та фармакотерапії; 2019 Вер 26-27; Тернопіль. Тернопіль: ТНМУ; 2018, с. 43.

11. Лой Г.Я, Олещук ОМ. Кардіопротективні ефекти препарату метформін в умовах метаболічного стресу та гіпоксії. Медична та клінічна хімія. 2019;3(80),(додаток):210.

12. Лой Г.Я, Олещук ОМ. Значення експресії гена FOXO1 у механізмі дії метформіну в H9C2 клітинах. В: Думенко ТМ, редактор. Матеріали науково-практичної конференції «Безпека та нормативно-правовий супровід лікарських засобів: від розробки до медичного застосування», 2019 Жовт 22-23, Київ. Київ: ДП "ДЕЦ" МОЗ України, 2019, с.25–6.

ЗМІСТ

| | стор. |
|--|-------|
| Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів..... | 18 |
| Вступ..... | 19 |
| Розділ 1 Фармакологічні властивості метформіну та обґрунтування доцільності його застосування у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу (огляд літератури)..... | 27 |
| 1.1 Цукровий діабет – неінфекційна епідемія ХХІ століття..... | 27 |
| 1.1.1 Епідеміологія, етіологія та патогенез цукрового діабету 2 типу..... | 27 |
| 1.1.2 Метформін як препарат вибору для лікування цукрового діабету 2 типу.. | 29 |
| 1.1.3 Фармакологічна характеристика метформіну..... | 31 |
| 1.2 Механізми ураження серця при цукровому діабеті..... | 34 |
| 1.2.1 Діабетична кардіоміопатія..... | 35 |
| 1.2.2 Інфаркт міокарда у пацієнтів із цукровим діабетом | 41 |
| 1.2.3 Кардіальна автономна нейропатія у пацієнтів із цукровим діабетом..... | 43 |
| 1.3 Кардіопротективні ефекти метформіну та механізми їх реалізації..... | 45 |
| Розділ 2 Матеріали та методи дослідження..... | 49 |
| 2.1 Культивування клітинної культури | 50 |
| 2.1.1 Методики індукування стресу, лікування та виявлення гіпертрофії..... | 51 |
| 2.1.2 Виявлення апоптичних клітин за допомогою методики TUNEL..... | 52 |
| 2.1.3 Методика проведення трансфекції клітин..... | 54 |
| 2.2 Дослідження на тваринах та експериментальні протоколи | 55 |
| 2.2.1 Моделювання ішемії-реперфузії у мишей | 55 |
| 2.2.2 Моделювання ізопротеренолової кардіоміопатії | 57 |
| 2.3 Морфогістологічні дослідження | 59 |
| 2.4 Імуногістохімічні дослідження..... | 60 |
| 2.4.1 Протокол імуногістохімічного забарвлення тканин для виявлення CD68–позитивних клітин..... | 60 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.4.2 | Протокол імунофлюоресцентного забарвлення тканин за допомогою аглютиніну із зародків пшениці (WGA)..... | 61 |
| 2.5 | Методика виділення тотальної РНК та проведення полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі..... | 61 |
| 2.5.1 | Протокол виділення тотальної РНК із Н9С2 клітин та тканин серця..... | 61 |
| 2.5.2 | Протокол проведення зворотної транскрипції | 63 |
| 2.5.3 | Методика проведення полімеразно-ланцюгової реакції в режимі реального часу..... | 64 |
| 2.6 | Методика проведення імуноферментного аналізу..... | 68 |
| 2.7 | Дослідження ліпідного спектру крові..... | 69 |
| 2.8 | Статистична обробка..... | 70 |
| | Розділ 3 Кардіопротективні ефекти препарату метформін в Н9С2 клітинах при гіпоксії та метаболічному стресі | 71 |
| 3.1 | Вивчення впливу метформіну на гіпертрофію Н9С2 клітин при метаболічному та гіпоксичному стресі..... | 72 |
| 3.2 | Вплив метформіну на процеси апоптозу Н9С2 клітин при метаболічному та гіпоксичному стресі..... | 74 |
| 3.3 | Вивчення механізму антигіпертрофічної та антиапоптичної дії препарату метформін в Н9С2 клітинах..... | 77 |
| | Розділ 4 Кардіопротективні ефекти препарату метформін при ішемії-реперфузії у мишей..... | 84 |
| 4.1 | Вплив метформіну на гіпертрофію кардіоміоцитів після ішемії- реперфузії міокарда у мишей | 84 |
| 4.2 | Вплив метформіну на апоптоз кардіоміоцитів після ішемії-реперфузії міокарда у мишей..... | 89 |
| 4.3 | Вплив метформіну на процеси фіброзу після ішемії-реперфузії міокарда у мишей..... | 92 |
| 4.4 | Вивчення протизапального ефекту препарату метформін після ішемії-реперфузії міокарда у мишей | 96 |

| | |
|--|-----|
| Розділ 5 Кардіопротективні ефекти препарату метформін при ізопротеренол-індукованому ураженні міокарда та ожирінні у щурів..... | 101 |
| 5.1 Вплив метформіну на масу тіла та стан ліпідного обміну у щурів, які отримували високожирову дієту..... | 101 |
| 5.2 Вплив метформіну на гіпертрофію, фіброз та експресію мозкового натрійуретичного пептиду при ізопротеренол-індукованому ураженні міокарда та ожирінні у щурів | 106 |
| Розділ 6 Аналіз та узагальнення результатів дослідження..... | 113 |
| Висновки..... | 131 |
| Список використаних джерел..... | 133 |
| Додатки..... | 158 |

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ,
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

| | | |
|----------------|---|--|
| ЦД | – | цукровий діабет |
| ДКМ | – | діабетична кардіоміопатія |
| ІМ | – | інфаркт міокарда |
| СН | – | серцева недостатність |
| КАН | – | кардіальна автономна нейропатія |
| ІР | – | інсулінорезистентність |
| АМФК | – | аденозинмонофосфатактивована протеїнкіназа |
| 2DG | – | 2-деокси-d-глюкоза |
| siРНК | – | малі інтерферуючі РНК |
| TBS | – | трис-буфер сольовий |
| BSA | – | альбумін бичачої сироватки |
| PBS | – | фосфатно-сольовий буфер |
| ЗТ-ПЛР | – | полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією |
| BNP | – | мозковий натрійуретичний пептид |
| ANP | – | предсердний натрійуретичний пептид |
| α -МНС | – | важкий ланцюг міозину альфа |
| β -МНС | – | важкий ланцюг міозину β |
| TNF- α | – | фактор некрозу пухлин |
| IL-6 | – | фактор некрозу пухлин |
| MCP-1 | – | моноцитарний хемоаттрактний протеїн-1 |
| α SMA | – | альфа-актин гладких м'язів |
| TGF- β_1 | – | трансформуючий ростовий фактор- β_1 |
| WGA | – | аглютинін із зародків пшениці |
| COL1A1 | – | колаген I типу |
| COL3A1 | – | колаген III типу |
| HFD | – | high fat diet, високожирова дієта |

ВСТУП

Актуальність теми. Цукровий діабет (ЦД) посідає третє місце серед причин смертності у світі. Захворюваність на ЦД зростає в геометричній прогресії [1]. Відомо, що ЦД – це захворювання, яке має високий показник тягара хвороби, ушкоджує практично всі органи і системи організму людини, спричиняє ранню інвалідизацію та смерть [2]. Серцево-судинні ускладнення є найпоширенішою причиною смертності у пацієнтів з ЦД. Діабетичне ураження серця найчастіше проявляється у вигляді ішемічної хвороби серця, автономної кардіальної нейропатії та діабетичної кардіоміопатії [3].

Кардіоміопатія є провідною причиною ускладнень і смертності при ЦД 2 типу. Діабетична кардіоміопатія (ДКМ) характеризується апоптозом, гіпертрофією та фіброзом, а також кардіальною дисфункцією, і визначається як функціональні та структурні зміни в міокарді, незалежні від судинних чи серцевих захворювань [4]. Гіпоксія та метаболічний стрес є провідними патофізіологічними предикторами розвитку діабетичної кардіоміопатії [5].

Ішемічна хвороба серця є лідером серед причин смертності у всьому світі. У діабетиків вона зустрічається навіть частіше, ніж у популяції в цілому [6], а наслідки після інфаркту міокарда (ІМ) є значно важчими [7]. Згідно із сучасними настановами рання реперфузія є оптимальною тактикою при ІМ, проте у діабетиків, у зв'язку із феноменом «реперфузійне ураження» [8], виникає підвищена чутливість до пошкодження міокарда внаслідок ішемії-реперфузії [9].

Ураження автономної нервової системи (АНС) при ЦД проявляється у вигляді кардіальної автономної нейропатії (КАН), яка є вагомим предиктором виникнення аритмій, дисфункції міокарда, а також асоціюється із підвищеним рівнем смертності [10]. КАН спричинена пошкодженням нервових волокон, що регулюють частоту серцевих скорочень, серцевий викид, скоротливість та електрофізіологію міокарда і тонус судин. Основними її симптомами є тахікардія у спокої, аритмії, інтраоперативна кардіоваскулярна нестабільність,

асимптоматична ішемія міокарда та інфаркт, що характеризується підвищеним рівнем смертності [11]. Центральним механізмом розвитку кардіальної автономної нейропатії є ураження блукаючого нерва та переважання симпатичного тону [12].

Тому на сьогодні актуальним є пошук засобів, які у пацієнтів із ЦД змогли б попередити розвиток ускладнень, зокрема, зі сторони серцево-судинної системи, підвищуючи внутрішню толерантність кардіоміоцитів до ішемії-реперфузії, обмежуючи зону некрозу при інфаркті, зменшуючи кардіальне ремоделювання.

Метформін є на сьогодні препаратом вибору з точки зору ефективності та безпеки монотерапії ЦД [13] і залишається лікарським засобом першої лінії для більшості пацієнтів із ЦД 2 типу у алгоритмі фармакотерапії ЦД 2 типу Американської діабетичної асоціації (ADA) зразка 2019 року [14]. Окрім гіпоглікемізуючого, він спричиняє інші важливі ефекти, зокрема, покращує кардіальну функцію та зменшує ризик інфаркту міокарда. Згідно із результатами The United Kingdom Prospective Diabetes Study кардіоваскулярні захворюваність і смертність є нижчими у пацієнтів, які отримують метформін, як порівняти із пацієнтами, які приймали інші гіпоглікемізуючі засоби, при однаковому глікемічному контролі [15].

Більшість досліджень показують, що метформін проявляє свої кардіопротективні властивості шляхом активації АМФ-активованої протеїнкінази, проте у дослідженні [16] йдеться про незалежний від АМФ-активованої протеїнкінази механізм дії метформіну у кардіоміоцитах. Дедалі очевиднішим стає той факт, що АМФК далеко не єдина мішень у механізмі дії метформіну.

Отже, враховуючи вищесказане, на сьогодні актуальним є дослідження фармакодинамічних ефектів метформіну шляхом визначення структурної організації міокарду при ЦД. Окрім того, поглибленого вивчення потребує питання щодо механізмів дії препарату, що дозволить обґрунтувати його фармакодинамічні ефекти. Розуміння молекулярних та генетичних мішеней

даного лікарського засобу є критично необхідним для розуміння особливостей його застосування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом планової науково-дослідної роботи кафедри фармакології із клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України на тему: "Фармакологічне дослідження кардіо- та гастропротекторного впливу біотехнологічних, рослинних та синтетичних лікарських засобів" (№ держреєстрації 0119U000617). Дисертант є співвиконавцем теми. Частина досліджень було виконано на базі Інституту кардіоваскулярних та метаболічних захворювань (Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, I2MC – UMR1048) при університеті Поля Сабатьє (Université Paul Sabatier) у місті Тулуза, Франція, у рамках програми академічної мобільності Erasmus + та за підтримки Національного інституту здоров'я та медичних досліджень (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Région Midi-Pyrénées).

Мета дослідження – дослідити кардіопротективні ефекти препарату метформін *in vivo* та *in vitro* в умовах гіпоксії та метаболічного стресу.

Завдання дослідження:

1. з'ясувати вплив препарату метформін на гіпертрофію H9C2 клітин в умовах метаболічного стресу та гіпоксії;
2. визначити вплив метформіну на апоптоз H9C2 клітин в умовах метаболічного стресу та гіпоксії;
3. дослідити потенційний механізм антигіпертрофічної дії метформіну в H9C2 клітинах;
4. дослідити потенційний механізм антиапоптичної дії метформіну в H9C2 клітинах;
5. з'ясувати кардіопротективні властивості метформіну в кардіоміоцитах на *in vivo* моделі ішемії-реперфузії міокарда у мишей та дослідити зміни в

експресії прогіпертрофічних, проапоптичних, прозапальних та профібротичних генів;

- б. визначити кардіопротективні властивості метформіну при індукованій ізопротеренолом кардіоміопатії у щурів з нормальною масою тіла або ожирінням.

Об'єкт дослідження: кардіопротективні ефекти препарату метформін.

Предмет дослідження: вплив метформіну на гіпертрофію, апоптоз, фіброз та запалення в кардіоміоцитах мишей і щурів та в H9C2 клітинах при гіпоксії і метаболічному стресі, механізм кардіопротективної дії метформіну в H9C2 клітинах.

Методи дослідження: патофізіологічні (моделювання метаболічного стресу, гіпоксії, гіпоксії-реоксигенації, ішемії-реперфузії та ізопротеренол-індукованої кардіоміопатії), біохімічні (визначення рівня загального холестеролу, ліпопротеїдів високої та низької щільності, триацилгліцеролу), морфометричні (визначення площі клітин), гістологічні (фарбування препаратів гематоксилін-еозином, сіріусом червоним, залізним гематоксиліном, за Ван-Гізеном), імунофлюоресцентні та імуногістохімічні (експресія кластера диференціювання 68 (CD68), Tunel та WGA staining), метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР) (оцінка відносного рівня мРНК генів α -MHC, β -MHC, BNP, α SMA, COL3A1, COL1A1, TGF- β ₁, Caspase-3, BAX, BCL2, CD68, MCP-1, IL-6, TNF α , FoxO1), імуноферментний аналіз сироваткового рівня мозкового натрійуретичного пептиду (BNP), метод трансфекції генів, методи статистичного аналізу отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. В результаті проведених досліджень встановлено, що протидіабетичний препарат метформін проявляє виражені кардіопротективні ефекти в умовах гіпоксії та метаболічного стресу. Експериментально *in vitro* та *in vivo* були відтворені основні моделі ураження міокарда, що найчастіше виникають при цукровому діабеті, а саме:

метаболический стресс, гипоксия, ишемия с последующей реперфузией и чрезмерный тонус симпатической нервной системы.

Впервые описано FoxO1-зависимый механизм антиапоптотической дії метформину в кардиомиоцитах, на что получено патент на изобретение (Патент Украины № 120567). Установлено, что ингибирование экспрессии гена привело к потере препаратом возможности защищать Н9С2 клетки от индуцированного гипоксией-реоксигенацией апоптоза. В то же время, связь между экспрессией FoxO1 и антигипертрофическим эффектом препарата не установлена. Однако результаты экспериментов показали, что при трансфекции гена FoxO1 возникает гипертрофия всех клеток, даже тех, которые культивировались в условиях нормоксии, поэтому наши исследования подтверждают, что он играет важную роль в поддержании нормальных размеров клеток.

Исследовано кардиопротективное влияние метформина на модели сердечной ишемии-реперфузии у мышей. Установлено, что введение препарата через 15 мин от начала реперфузии и в течение следующих 13 дней предотвращает ремоделирование миокарда и репрограммирование фетальных генов, уменьшая гипертрофию, апоптоз, воспаление и фиброз. В частности, метформин предотвращает ап-регуляцию генов BNP, α SMA, COL3A1, CD68, обусловленную ишемией-реперфузией.

Кардиопротективные свойства метформина подтверждены у крыс с изопроterenол-индуцированным повреждением сердца. Установлено, что препарат предотвращает увеличение массы тела, уменьшает уровень триацилглицерола у крыс, которые получали диету с повышенным содержанием жира (45 %) в рационе, и предотвращает гипертрофическое и фибротическое ремоделирование миокарда, снижая уровень BNP в сыворотке крови, как при нормальной массе тела, так и при ожирении.

Практическое значение полученных результатов. Проведенные исследования представляют практический интерес для современной фармакологии, эндокринологии и диабетологии. Установление молекулярных механизмов дії метформина позволяет объяснить его новые фармакодинамические эффекты, расширить спектр показаний к применению данного препарата. Метформин проявляет выраженные кардиопротективные свойства в условиях гипоксии, метаболических нарушений, а

також при ішемії-реперфузії та надмірній симпатичній стимуляції. Це обґрунтовує його застосування як препарату, що попереджує розвиток і зменшує прояви основних форм ураження міокарда при цукровому діабеті, та, можливо, як лікарського засобу для лікування захворювань серцевого м'яза недіабетичного генезу. Крім того, з'ясування FoxO1-залежного механізму дії метформіну та його впливу на експресію різноманітних генів дає можливість кращого розуміння фармакодинамічних особливостей та створює перспективи для майбутніх досліджень молекулярних мішеней препарату на шляху реалізації нових і відомих фармакологічних ефектів.

Основні положення дисертаційної роботи впроваджені у практику наукових досліджень і навчальний процес на кафедрах фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Івано-Франківського національного медичного університету, Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет» (додатки В1-В5).

Результати дослідження, що дозволили встановити механізм антиапоптичної дії метформіну, були запатентовані (Патент України № 120567).

Особистий внесок здобувача. Дисертантка самостійно здійснила патентно-інформаційний пошук, провела аналіз вітчизняних і закордонних інформаційних джерел відповідно до теми дослідження. Здобувачем виконано експериментальне моделювання досліджуваної патології, проведено статистичний аналіз отриманих результатів, розроблено основні теоретичні та практичні положення роботи. Спільно з науковим керівником проф. Олещук О.М. здійснено вибір теми дисертаційної роботи, проведено аналіз та узагальнення отриманих результатів, обґрунтування та формулювання висновків. Під керівництвом наукового керівника доктора Оксани Кундузової проведені дослідження на H9C2 клітинах та мишах з ішемією-реперфузією. Автором написано всі розділи дисертації. У наукових працях, що містять

результати дисертаційних досліджень, використано фактичний матеріал, отриманий автором у процесі виконання роботи.

Дисертація виконана на базах Інституту кардіоваскулярних та метаболічних захворювань м. Тулуза, Центральної науково-дослідної та Міжкафедральної навчально – дослідної лабораторій Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, отримані в процесі виконання дисертаційної роботи, оприлюднені на наступних конференціях: Підсумковій LXI науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (7 червня 2018 року, м.Тернопіль); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні аспекти діагностики і лікування захворювань внутрішніх органів» (11–12 жовтня 2018 року, м. Тернопіль); XXII Міжнародному медичному конгресі студентів і молодих вчених (15-17 квітня 2019 р., м.Тернопіль); I International distance scientific and practical conference of students and young scientist «Future perspectives of science and education» (16-17 May 2019, West Kazakhstan Marat Ospanov State Medical University); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання фармакології та фармакотерапії» (26-27 вересня 2019 року, м. Тернопіль); XII Українському біохімічному конгресі (30 вересня – 4 жовтня 2019 року, м.Тернопіль); Науково-практичній конференції «Безпека та нормативно-правовий супровід лікарських засобів: від розробки до медичного застосування» (22-23 жовтня 2019 року, м. Київ).

Публікації. Результати дисертаційного дослідження висвітлено у 12 наукових працях, серед яких 3 статті у фахових виданнях України; 1 стаття у періодичному науковому виданні іншої держави, що входить до Організації економічного співробітництва та розвитку та Європейського Союзу, проіндексованому у базі даних Scopus та віднесеному до першого квартилю (Q1), 7 публікацій у матеріалах і тезах наукових форумів, 1 патент на винахід.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із анотації, вступу, шести розділів, висновків, списку використаних джерел (244 найменувань, у тому числі 26 – кирилицею та 218 – латиницею), додатків. Дисертація викладена на 167 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстрована 7 таблицями і 29 рисунками.

РОЗДІЛ 1
ФАРМАКОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МЕТФОРМІНУ ТА
ОБГРУНТУВАННЯ ДОЦІЛЬНОСТІ ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ У
ПАЦІЄНТІВ З ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ
(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Цукровий діабет – неінфекційна епідемія XXI століття

1.1.1 Епідеміологія, етіологія та патогенез цукрового діабету 2 типу

Цукровий діабет – це хронічне захворювання, яке виникає при недостатній продукції інсуліну підшлунковою залозою або при нездатності організму ефективно використовувати цей гормон. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) визначає ЦД як одне із чотирьох пріоритетних неінфекційних захворювань, оскільки число його випадків та поширеність невпинно зростають [17].

За даними ВООЗ у 2014 році на ЦД страждало 422 мільйони дорослого населення планети. Глобальний рівень захворюваності на діабет (стандартизований за віком) майже подвоївся з 1980 року, збільшившись з 4,7 % до 8,5 % дорослих. Діабет став причиною смерті 1,5 мільйона людей у 2012 році [17].

Порівняно з іншими едокринними хворобами ЦД характеризується більш ранньою інвалідизацією. У різних країнах товариства сліпих на 60–85 % формують хворі на ЦД. Серед таких пацієнтів ІМ діагностується у 2–5 разів частіше, ніж у популяції того ж віку; гангрена нижніх кінцівок трапляється у 200 разів частіше; 50–70 % усіх ампутацій нижніх кінцівок, не пов'язаних із травматизмом, припадає на хворих із діабетом [18].

Як і в усьому світі, в Україні число хворих зростає здебільшого через захворюваність на ЦД 2 типу. ЦД 2 типу – це порушення вуглеводного обміну, спричинене переважаючою інсулінорезистентністю і відносною інсуліновою

недостатністю або дефектом секреції інсуліну з інсулінорезистентністю або без неї [18].

На ЦД 2 типу припадає 90-95 % усіх випадків хвороби [1]. Захворюваність на ЦД 2 типу неухильно зростає у зв'язку зі збільшенням числа осіб із надмірною масою тіла, ожирінням та іншими чинниками ризику [19]. Ожиріння є основною причиною розвитку інсулінорезистентності, яка відіграє вирішальну роль у виникненні ЦД 2 типу [20]. Більшість пацієнтів із ЦД 2 типу мають надмірну вагу або ожиріння, що є передумовою для розвитку інсулінорезистентності. Пацієнти, які не мають ожиріння або надмірної маси за традиційними масовими критеріями, можуть мати підвищений відсоток жиру в організмі, який розподіляється переважно в області черевної порожнини. Інсулінорезистентність може зменшуватися за рахунок зниження маси тіла та/або фармакологічного лікування гіперглікемії, але рідко повертається до норми [21].

Характерною ознакою інсулінорезистентності є знижене периферичне захоплення глюкози (переважно у м'язах) у поєднанні із посиленою ендогенною продукцією глюкози [22]. Посилений ліполіз, підвищений рівень вільних жирних кислот, а також накопичення проміжних ліпідних метаболітів сприяють подальшому збільшенню утворення глюкози, зменшенню периферичної утилізації глюкози та порушенню функції β -клітин [23]. Компенсаторна секреція інсуліну β -клітинами підшлункової залози може підтримувати нормальний рівень глюкози в плазмі крові [1], але функція β -клітин, яка вже є порушеною на цьому етапі захворювання, в подальшому погіршується ще інтенсивніше [24].

Одночасно відбувається невідповідне потребам вивільнення глюкагону з α -клітин підшлункової залози, особливо в постпрандіальному періоді. Встановлено, що як зниження секреції інсуліну, так і надмірне виділення глюкагону при ЦД 2 типу зумовлені «інкретинним дефектом», що характеризується порушеною відповіддю на гормони-інкретини шлунково-кишкового тракту після прийому їжі [25].

Крім того, гіпоталамічна резистентність до інсуліну також погіршує здатність циркулюючого інсуліну пригнічувати продукцію глюкози [26], а ренальна реабсорбція глюкози посилюється. Всі вищезгадані патофізіологічні ланки слід враховувати при лікуванні гіперглікемії у пацієнтів із ЦД 2 типу [27].

Оскільки початкові порушення вуглеводного обміну часто протікають безсимптомно, при первинному встановленні діагнозу ЦД 2 типу у багатьох пацієнтів вже наявні мікро- й макросудинні ускладнення [28].

Контроль за рівнем глікемії залишається основною метою при лікуванні пацієнтів із ЦД 2 типу. Однак, це завжди повинно супроводжуватися низкою заходів щодо зменшення серцево-судинних факторів ризику, відмовою від куріння, освоєнням звичок здорового способу життя, контролем кров'яного тиску та ліпідного спектру крові, а в деяких випадках антитромбоцитарною терапією [29].

Таким чином, актуальною залишається проблема вивчення патогенезу ЦД 2 типу і його ускладнень, та, відповідно, їх фармакокорекції, про що свідчить невпинне зростання захворюваності та високі показники інвалідизації та смертності.

1.1.2 Метформін як препарат вибору для лікування цукрового діабету 2 типу

Основними напрямками фармакотерапії ЦД 2 типу є досягнення рівня глюкози крові, максимально наближеного до нормального, без високого ризику гіпоглікемій, збереження функції β -клітин і зменшення інсулінорезистентності. Механізми дії цукрознижувальних препаратів різні, але в цілому спрямовані на усунення трьох основних метаболічних порушень, що призводять до гіперглікемії при ЦД 2 типу: порушення секреції інсуліну підшлунковою залозою, периферичної інсулінорезистентності та надмірної продукції глюкози печінкою [14].

Незважаючи на значний арсенал гіпоглікемізуючих лікарських засобів, компенсація ЦД 2 типу досягається лише в половини хворих [30]. Доцільність призначення адекватної патогенетично обґрунтованої цукрознижувальної терапії підтверджена її впливом на прогностично значущий показник глікованого гемоглобіну (HbA1c). Доведена важливість глікемічного контролю, показано сприятливий ефект раннього інтенсивного контролю глюкози крові для вперше діагностованих хворих на ЦД 2 типу [15, 30]. Встановлено, що досягнення цільових рівнів HbA1c асоціюється з максимально позитивним клінічним ефектом терапії [32].

Американська діабетична асоціація (ADA) та Європейська асоціація із вивчення діабету (EASD) [29] рекомендують як основну стратегію вибору цукрознижувальної терапії індивідуальний підхід до пацієнта, що включає оцінку кількох аспектів: ефективність лікування, ризик гіпоглікемій, вплив на масу тіла, побічні ефекти, вартість препаратів, а також прихильність хворого до лікування.

Першим етапом лікування ЦД 2 типу залишається модифікація способу життя, що обумовлено позитивним впливом зниження маси тіла та збільшення фізичної активності на вуглеводний і ліпідний обміни. Одночасно зі зміною способу життя розпочинають медикаментозну терапію [14].

Загальновизнаним є те, що при призначенні стартової терапії ЦД 2 типу найкращим є вибір препаратів, що не виснажують функцію β -клітин, сприяють зниженню маси тіла, мають мінімальний ризик розвитку гіпоглікемій [33].

Як і в попередні роки, у новому алгоритмі терапії ЦД 2 типу ADA зразка 2019 року метформін рекомендований як препарат першої лінії для стартової фармакотерапії ЦД 2 типу в дітей і дорослих при відсутності протипоказань. Крім того, метформін залишається препаратом вибору з точки зору ефективності та безпеки для монотерапії ЦД 2 типу [14].

На сьогодні метформін є одним із препаратів, який найчастіше призначають пацієнтам у світі. Його застосовують як монотерапію, так і в комбінації з іншими антидіабетичними агентами, включаючи препарати

сульфонілсечовини, інгібітори α -глюкозидази, інсулін, тiazолідиндіони, інгібітори дипептилпептидази-4, агоністи глюкагоноподібного пептиду 1 [34].

Метформін (N, N-dimethylbiguanide) належить до класу бігуаніди (містить два пов'язані гуанідинові кільця). Серед трьох представників бігуанідів, розроблених для фармакотерапії ЦД 2 типу, метформін має найвищий профіль безпеки та характеризується високою толерантністю пацієнтів. Метформін широко застосовується при лікуванні ЦД 2 типу упродовж більш, ніж 50 років [35].

Препарат безпечний та ефективний як в монотерапії, так і в комбінації з іншими пероральними антидіабетичними засобами та інсуліном. Найбільшими його клінічними перевагами є те, що він не викликає гіпоглікемій та збільшення маси тіла [36]. Крім того, метформін характеризується високою антигіперглікемічною ефективністю та володіє високим профілем серцево-судинної безпеки [15,37].

Зростає зацікавленість фахівців у застосуванні метформіну для лікування синдрому полікістозних яєчників, діабетичної нефропатії, гестаційного діабету [38]. Препарат попереджає серцево-судинні ускладнення, пов'язані з діабетом [15] та зменшує ризик виникнення раку [38,39].

1.1.3 Фармакологічна характеристика метформіну

Вперше метформін був використаним у клінічній практиці у 1958 році, проте досі він залишається золотим стандартом у лікуванні ЦД 2 типу та є єдиним представником групи біуганідів. Хоча інші біуганіди заборонені на фармацевтичному ринку у зв'язку із підвищеним ризиком лактатацидозу та негативним впливом на серцево-судинну систему, ретроспективний аналіз застосування метформіну свідчить про його безпеку та відсутність серйозних побічних ефектів [40].

Метформін застосовується перорально у дозі 2550-3000 мг або 35 мг/кг на добу. У зв'язку із низькою ліпофільністю, його проникність через клітинні

мембрани шляхом пасивної дифузії обмежена. Абсорбція у проксимальних відділах тонкого кишечника, захоплення гепатоцитами та екскреція відбуваються за допомогою органічних катіонних транспортерів (ОСТ). Біодоступність препарату – $(55 \pm 16) \%$. Пікова плазмова концентрація виникає через 3 год після прийому препарату [41].

Смертельна доза 50 % метформіну коливається від 350 мг/кг у кроликів до 3500 мг/кг у мишей [42].

Метформін акумулює в тканинах шлунково-кишкового тракту, що вважається вагомим чинником у виникненні диспепсичних явищ, а також в еритроцитах [43]. Із альбумінами плазми крові зв'язування не відбувається. Період напіввиведення із плазми крові становить 5 год, проте в еритроцитах і ШКТ він знаходиться значно довше ($T_{1/2}$ – 16 год). Накопичується у печінці, нирках, наднирникових залозах та підшлунковій залозі. Виведення відбувається переважно із сечею у незміненому вигляді, проте частина препарату (20-30 %) екскретується із калом [41].

Незважаючи на те, що препарат у клініці застосовується понад 60 років, точний механізм дії метформіну досі залишається недостатньо вивченим [38].

Насамперед метформін підвищує чутливість рецепторів до інсуліну, що веде до зниження його рівня у плазмі крові натще та зменшення інсулінорезистентності. Такий ефект можна пояснити позитивним впливом препарату на експресію рецепторів інсуліну та активність тирозинкінази [44].

Метформін значно підвищує рівень глюкагоноподібного пептиду 1 (GLP-1) в плазмі крові та індукує експресію гена інкретинового рецептора острівця Лангерганса через залежний від пероксисомних проліфератор-активованих рецепторів (PPAR) – α механізм [45].

Проте, основна роль відводиться здатності метформіну знижувати продукцію глюкози печінкою шляхом пригнічення глюконеогенезу [46]. Вивчаються також інші можливі інгібіторні механізми на печінковий глюконеогенез, зокрема, зміни ферментної активності [47].

Упродовж багатьох років молекулярна мішень метформіну залишалася невідомою [38], проте на сьогодні з'ясовано, що активація АМФ-активованої протеїнкінази (АМФК) тісно пов'язана з плейотропними ефектами метформіну [48].

АМФК є багатокомпонентним ферментом, основним регулятором ліпідних шляхів біосинтезу завдяки своїй ролі в фосфорилуванні та інактивації ключових ензимів, таких як ацетил-КоА карбоксилаза [49]. Вважається також, що АМФК відіграє ще важливішу функцію у метаболічній регуляції, включаючи окиснення вільних жирних кислот, захоплення глюкози скелетними м'язами [50], експресію сАМР-стимульованих глюконеогенезних генів (PEPCK та G6Pase) [51] і глюкозо-стимульованих генів, пов'язаних із печінковим ліпогенезом, включаючи синтази жирних кислот (FAS), Spot-14 (S14), а також і L-тип піруваткінази [52]. До того ж хронічна активація АМПК може викликати експресію м'язової гексокінази та транспортера глюкози (Glut4), що імітує наслідки інтенсивних тренувань [53].

АМФК вважається сенсором енергетичного обміну, оскільки вона є чутливою до клітинного співвідношення АМФ:АТФ [54]. Будучи активованою, АМФК переводить клітини з анаболічного до катаболічного стану, виключаючи синтетичні шляхи, що споживають АТФ, і відновлює енергетичний баланс. Як основний внутрішньоклітинний датчик енергії АМФК стає важливою мішенню при метаболічних порушеннях, особливо при ЦД 2 типу та захворюваннях печінки. Через це гіпоглікемізуючий ефект метформіну пов'язаний з активацією печінкової АМФК [55].

Пригнічення клітинного дихання, незалежно від причини, знижує глюконеогенез у печінці [56]. Метформін інгібує дихальний ланцюговий комплекс I, що обмежує здатність печінки продукувати глюкозу, у той час, як периферичне захоплення глюкози тканинами зростає [57].

У дослідженнях останніх років вивчаються нові альтернативні шляхи, які, ймовірно, залучені до контролю метформіном гомеостазу глюкози [58]. Наприклад, метформін пригнічує активність АМФ-деамінази (АМФД).

Виключення експресії АМФД нівелювало стимуляцію метформіном транспортування глюкози [59].

Таким чином, володіючи багатовекторним терапевтичним впливом на різні патофізіологічні ланки ЦД 2 типу, метформін залишається засобом вибору для лікування цього захворювання. Незважаючи на те, що історія застосування препарату налічує уже декілька десятиліть, актуальність вивчення його фармакологічних ефектів важко переоцінити. Попри наявність результатів масштабних досліджень, механізм дії метформіну досі недостатньо вивчений.

1.2 Механізми ураження серця при цукровому діабеті

Несвоєчасне виявлення гіперглікемії або гіпоглікемії загрожує життю або здоров'ю пацієнта. За даними ВООЗ приблизно половина всіх смертей безпосередньо або опосередковано пов'язана із виникненням гіперглікемії. Чим ближчий рівень глюкози до нормальних (фізіологічних) значень, тим нижчі ризики для здоров'я [17]. Глюкоза – найсильніший окислювач білків, тому існуюча тривалий час гіперглікемія неминуче призводить до пошкодження клітин і тканин [60].

ЦД є основною причиною пандемічного зростання кількості мікро- та макросудинних ускладнень, що стає соціальним та економічним тягарем у всьому світі. Ця хвороба вражає практично всі тканини в організмі та викликає виражену дисфункцію органів. Серед смертності від серцево-судинних захворювань понад 65 % становлять пов'язані із ЦД випадки [3].

Діабетичне ураження серця найчастіше проявляється у вигляді ішемічної хвороби серця, автономної кардіальної нейропатії та діабетичної кардіоміопатії (ДКМ) [3].

1.2.1 Діабетична кардіоміопатія

Діабетична кардіоміопатія є однією із основних причин термінальної стадії серцевої недостатності (СН), що часто призводить до раптової зупинки серця та смерті [5]. Серед усіх інших коморбідних із СН станів найвищою була смертність при ДКМ, яка зустрічалася у 60 % пацієнтів [61]. Фактична поширеність ДКМ ще не встановлена через відсутність достатньої кількості даних про дослідження серед різних груп населення, які страждають на ЦД [3].

Патогенез і патофізіологія ДКМ не вивчені достатньо. Її розвиток є багатофакторним і включає такі механізми як метаболічні порушення, резистентність до інсуліну, мікросудинні захворювання, зміни в системі ренін-ангіотензину, вегетативна дисфункція серця та фіброз міокарда [62].

ДКМ гістологічно характеризується апоптозом, гіпертрофією та фіброзом, функціонально – кардіальною дисфункцією, що виникають незалежно від судинних чи серцевих захворювань [4].

Основними аномаліями при ЦД є гіперглікемія, гіперліпідемія і запалення. Вони стимулюють утворення реактивних форм кисню та азоту, які викликають більшість діабетичних ускладнень, включаючи діабетичну нефропатію та кардіоміопатію [63]. Викликані цими метаболічними аномаліями адаптивні реакції, врешті, призводять до дисфункції серця та СН [3]. Відомо, що ДКМ обумовлена фокальною втратою клітин внаслідок мікросудинного спазму та реперфузного пошкодження з подальшим розвитком фокального фіброзу та реактивної гіпертрофії у відповідь на некроз міокарда [62].

Вважається, що хронічна гіперглікемія відіграє центральну роль у розвитку патології, хоча численні комплексні механізми, взаємодія багатьох молекулярних і метаболічних процесів в міокарді та плазмі крові сприяють патогенезу [3]. Вона спричиняє численні метаболічні та молекулярні зміни у кардіоміоцитах [64].

Підвищений внаслідок гіперглікемії метаболізм глюкози призводить до посилення оксидативного стресу шляхом утворення активних форм кисню у

мітохондріях [64], які окислюють цитоплазматичні ліпіди в ліпідні пероксиди. Реактивні форми кисню та ліпідні пероксиди викликають пошкодження клітин і мітохондрій, а також порушують мітохондріальний окислювальний метаболізм [65]. Надмірна продукція супероксиду мітохондріальним дихальним ланцюгом викликає зниження скоротливої здатності міокарда, що, зрештою, веде до фіброзу кардіоміоцитів [66], пошкодження ДНК та пришвидшеного апоптозу кардіоміоцитів [3].

Рушійною силою оксидативного стресу при гіперглікемічних умовах є також редукований стрес, який характеризується накопиченням НАДН внаслідок пошкодження комплексу 1 в електронно-транспортному ланцюгу [67]. Це призводить до псевдогіпоксії, стану, при якому клітини не реагують належним чином на кисень. Одночасний вплив гіпоксії та гіперглікемії ще швидше погіршує стан метаболізму, оскільки при гіпоксичних умовах збільшується продукція лактату [68].

Хронічна гіперглікемія може призвести до активації альтернативних шляхів метаболізму глюкози. Гексозаміновий шлях пов'язаний із несприятливими наслідками ЦД внаслідок зменшення надходження кальцію в саркоплазматичний ретикулум [69]. В поліоловому шляху глюкоза перетворюється на сорбітол під дією ферменту альдозоредуктази в присутності НАДФ•Н, який окислюється до НАДФ+. Посилена утилізація НАДФ•Н викликає порушення окисно-відновного балансу в клітинах, а спровокований оксидативний стрес може призвести до пошкодження ДНК та апоптозу кардіоміоцитів [70].

У здорових людей в результаті метаболізму глюкози та вільних жирних кислот утворюється еквівалентна кількість енергії, необхідної для скорочень міокарда [4]. У пацієнтів із ЦД використання міокардом глюкози значно знижене і не може забезпечити його енергетичні потреби, внаслідок чого посилюється β -окислення вільних жирних кислот [71]. Підвищений рівень вільних жирних кислот у плазмі крові, що виникає при ЦД 2 типу та ожирінні, призводить до їх посиленого захоплення кардіоміоцитами та накопичення

триацилгліцеролу. Як наслідок, виникає ліпотоксичне ураження серця. Частина надлишку жирних кислот метаболізується в неоксидативних шляхах, внаслідок чого утворюються токсичні проміжні продукти, такі як церамід. Ці речовини, у свою чергу, порушують нормальні обмінні та енергетичні процеси в клітинах, викликають дисфункцію мітохондрій, пошкодження клітин, апоптоз, фіброз міокарда та скорочувальну дисфункцію [3].

Клітинна інсулінорезистентність може передувати явному ЦД протягом десятиліття або й довше і вимагає компенсаторного підвищення рівня інсуліну плазми для підтримки гомеостазу глюкози, головним чином у скелетних м'язах та печінці [72]. У свою чергу, гіперінсулінемія є важливим тригером розвитку гіпертрофії серця при ДКМ [73].

Гіпертрофія міокарда є однією із найбільш поширених ознак діабетичної кардіоміопатії [4].

Декілька епідеміологічних досліджень показали, що існує чіткий зв'язок між ДКМ та наявністю гіпертрофії кардіоміоцитів і підвищеної жорсткості міокарда, незалежних від гіпертонії [74,75].

Кардіальна гіпертрофія є адаптивним механізмом [76]. У відповідь на механічні, гемодинамічні, гормональні та патологічні подразники серце пристосовується до підвищених потреб для серцевої діяльності шляхом збільшення м'язової маси через ініціювання гіпертрофічної реакції [77]. Хоча гіпертрофічна відповідь спочатку є компенсаторним механізмом, стійка гіпертрофія може призвести до дилатаційної кардіоміопатії, СН та раптової смерті [76]. Гіпертрофія є кінцевою молекулярною реакцією кардіоміоцитів на різноманітні гіпертрофічні сигнали [78]. Отже, гіпертрофія серця є важливим фактором ризику СН [76].

На молекулярному рівні гіпертрофія кардіоміоцитів вважається результатом дисбалансу між прогіпертрофічними та антигіпертрофічними факторами та їх механізмами, що контролюють ріст клітин [79].

На клітинному рівні гіпертрофія кардіоміоцитів характеризується збільшенням розмірів клітин, посиленням синтезу білків та підвищеною організацією саркомерів [80].

Механізм виникнення кардіальної гіпертрофії при ЦД 2 типу полягає у тому, що на фоні системної гіперінсулінемії, яка є результатом інсулінорезистентності, посилюються ефекти інсуліну в клітинах, які не втрачають чутливості до гормону, зокрема, у кардіоміоцитах. Отже, гіпертрофія є проявом мітогенної дії інсуліну [81,82].

Встановлено, що гіпертрофія кардіоміоцитів при ЦД регулюється на рівні транскрипції [83]. Різні генетичні та епігенетичні порушення, викликані гіперінсулінемією, призводять до активації множинних факторів транскрипції, які модулюють експресію клітинних і позаклітинних білків. Показано, що активація таких транскрипційних факторів призводить до гіпертрофії кардіоміоцитів та зміщення білків позаклітинних матриксів [84].

Характерною рисою гіпертрофованих кардіоміоцитів є збільшення їх розмірів, порівняно з нормальними клітинами. *In vitro* дослідження культивованих неонатальних кардіоміоцитів показали, що збільшення розмірів кардіоміоцитів під впливом гіпертрофічних стимулів пов'язане із посиленням саркомерогенезу та збільшенням експресії натрійуретичних пептидів [80].

Кінцевим наслідком кардіальної гіпертрофії є СН із дилатацією шлуночка та прогресуючим зниженням серцевого викиду, що призводить до вентрикулярної дисфункції та злоякісної аритмії [79].

Смерть клітин є потенційним патофізіологічним фактором у механізмі трансформації гіпертрофії кардіоміоцитів як адаптивного явища у СН [85].

При ЦД міокард має вищу схильність до загибелі міоцитів як шляхом апоптозу, так і некрозу [4].

Некроз є проявом деструкції міоцитів, спричиненої біохімічними ушкодженнями. Некроз – це швидкий і незворотний процес, який проявляється набряком клітини та її органел, ураженням мітохондрій, розривом мембрани та лізисом. Вивільнення клітинного вмісту в навколишнє середовище може

призвести до пошкодження або смерті сусідніх клітин, тому некроз має деструктивний характер [86].

Апоптоз – це активний генетично контрольований процес, який утилізує небажані або пошкоджені клітини [86], та характеризується збереженням цілісності органел і утворенням поверхневих молекул, які швидко фагоцитуються [87]. Морфологічними ознаками апоптозу є зморщення клітин, конденсація хроматину, фрагментація ДНК, мембранний блеббінг і формування апоптичних тіл [88].

Апоптоз є високоорганізованим енергозалежним механізмом, який не завдає шкоди навколишнім тканинам. На відміну від некрозу, подрібнений клітинний вміст поступово всмоктується в навколишні тканини без виникнення будь-якої запальної реакції. Залишки клітин поглинаються макрофагами або моноцитами [89].

Наслідки некрозу та апоптозу кардіоміоцитів також відрізняються. Апоптоз не спричиняє формування рубця та інтенсивного накопичення колагену у інтерстиції та характеризується фрагментацією ядер і зморщенням клітин, які заміщуються згодом сусідніми клітинами [90]. Некроз міоцитів, навпаки, призводить до розширення міжклітинних просторів і посиленого дифузного або розсіяного накопичення колагену, що в результаті призводить до фіброзу та проліферації клітин сполучної тканини [91].

Мітохондрії відіграють ключову роль в апоптозі. Вони не лише забезпечують енергію, необхідну для здійснення апоптозу, а також вивільняють важливі проапоптичні фактори в цитозоль. Мітохондрії є основним місцем дії регуляторних білків апоптозу сімейства Bcl-2 та джерелом активних форм кисню, які залучені у процес пошкодження і смерті клітин [92].

Апоптоз контролюється комплексною взаємодією численних сигналів, що відповідають за виживання і смерть клітин. До антиапоптичних належать протеїни Bcl-2 та Bcl-x_L, а до проапоптичних – Bax, Bid, а їхні ефекти реалізуються на рівні мітохондрій [93].

Інші важливі регулятори апоптозу діють на рівні каспаз. Стимуляція «смертельних» рецепторів призводить до активації каспази-8, яка активує каспазу-3, ключовий ефекторний білок апоптичного механізму [85].

Врешті-решт, загибель клітин міокарда призводить до інтерстиціального фіброзу, незворотних морфологічних змін, що посилюють серцеву дисфункцію. Некроз та апоптоз кардіоміоцитів є основними причинами формування фіброзу [5]. Фіброз міокарда поряд із гіпертрофією міоцитів є основними механізмами, що пояснюють серцеві зміни при ДКМ [4].

Розподіл фіброзної тканини в міокарді може бути інтерстиціальним, периваскулярним або змішаним, внаслідок чого виникають такі зміни як гіпертрофія міокарда, інтерстиціальний фіброз, потовщення капілярних базальних мембран. Проте, оскільки смерть клітин при ДКМ спричинена не лише некрозом, але й апоптозом, інтерстиціальний фіброз може бути виражений помірно [94].

Гіперглікемія та гіперінсулінемія стимулюють надмірну експресію трансформуючого фактора росту- β_1 (TGF- β_1) фібробластами серця, що супроводжується утворенням фіброзної тканини та синтезом позаклітинного матриксу [94] за рахунок надмірної продукції колагену типів I та III [5]. Важливо те, що кількість мРНК обох типів колагену після інфаркту міокарда підвищена також в неінфарктній зоні, тому підвищений фіброз спостерігається як в місці некрозу, так і в неушкодженій тканині. Надмірний синтез протеїнів колагену у неінфарктній ділянці міокарда не пов'язаний із некрозом кардіоміоцитів, а є прикладом реактивного фіброзу, який характеризується заповненням міжм'язових просторів колагеновими волокнами та підвищеним периваскулярним фіброзом навколо більшості коронарних артерій [1]. Надмірне депонування колагену, врешті, спричиняє надмірну жорсткість міокарда та є причиною аритмогенності і коронарної вазомоторної реактивності [95].

1.2.2 Інфаркт міокарда у пацієнтів із цукровим діабетом

Популяційні дослідження встановили, що інфаркт міокарда у діабетиків виникає достовірно частіше, ніж у пацієнтів без ЦД [96]. Більше того, наслідки інфаркту у таких пацієнтів значно важчі, що підвищує ризик його повторного виникнення та смерті [97].

Постінфарктні структурні зміни у серці, які об'єднують під терміном «ремоделювання міокарда», включають гіпертрофію, інтерстиціальний фіброз, прогресуюче стоншення стінок і дилатацію камери шлуночка, які врешті призводять до прогресування кардіальної дисфункції та СН [98]. До того ж виникають порушення у регуляції нейрогуморальних сигнальних шляхів, тому, окрім кардіоміоцитів, у патогенез ремоделювання залучаються фібробласти, ендотеліоцити та клітини імунного захисту [99]. Ремоделювання міокарда, що є наслідком інфаркту, розпочинається швидко, в перші години, та триває від кількох тижнів до місяців [100], а його обсяг корелює із розміром зони некрозу та залежить від якості лікувальної тактики [101].

Загоєння в зоні інфаркту міокарда відбувається у 3 фази: запалення, проліферації та дозрівання [102].

Клітини, які гинуть шляхом некрозу, вивільняють внутрішньоклітинний вміст, що запускає інтенсивний запальний процес, що характеризується активацією природніх імунних сигналів, які індукують експресію цитокінів і хемокинів. Це призводить до вираженої інфільтрації нейтрофілами та мононуклеарними клітинами, які очищають ділянку некрозу від мертвих клітин та залишків матрису [101].

Міграція нейтрофілів та макрофагів до міокарда керується сигналами від ушкоджених міоцитів та клітин запалення, а їх накопичення та затримка у ділянці інфаркту здійснюється завдяки локальному синтезу хемоатрактантів, молекул адгезії та різноманітних протеїнів. Активовані макрофаги, у свою чергу, продукують цитокіни, хемокини та протеази [103], а також експресують глікопротеїн CD68 [104].

Цитокіни, які є тригерами запальної клітинної відповіді, вивільняються ураженим міокардом, щоб модулювати відновлення тканини та адаптацію після ушкодження, регулювати виживання та апоптоз кардіоміоцитів. При тривалих запальних процесах цитокіни беруть участь у репарації та ремоделюванні через активацію матриксних металопротеїназ і синтез колагену [105].

Виражена ап-регуляція інтраміокардіальних цитокінів спостерігається у перші години після ІМ і упродовж доби може повернутися до базального рівня, якщо зона некрозу обмежена. Проте, при обширному інфаркті міокарда підвищений рівень цитокінів може виникати у вигляді повторної хвилі, залучаючи у процес неінфарктні ділянки, що, врешті, призводить до тотального ремоделювання міокарда [105].

Запальна відповідь є визначальною у формуванні фіброзу [106] та є однією із детермінант наслідків ІМ [107].

Стадія проліферації розпочинається із інфільтрації зони інфаркту фібробластами та ендотеліальними клітинами. Міофібробласти продукують колаген, необхідний для стабілізації пошкодженої або втраченої тканини, та попереджують експансію інфаркту і шлуночкову дисфункцію. У той же час, спостерігається їхня підвищена проліферація і в неуразеній ділянці міокарда, що сприяє розвитку надмірного ремоделювання [108].

Стадія дозрівання пов'язана із формуванням зрілого рубця, а також геометричними та функціональними змінами шлуночків. Гіпертрофія кардіоміоцитів неінфарктних зон, дилатація та надмірна сферичність камер є основними геометричними змінами у ремодельованому внаслідок ІМ серці. Втрата м'язової тканини шлуночка та комплексні зміни його архітекtonіки як у зоні ІМ, так і поза його межами, призводять до розвитку СН [108].

Розмір зони некрозу є основним детермінантом надмірного ремоделювання, хоча неабияке значення відіграють також навантаження на шлуночок та якісні характеристики процесу загоєння рани. Наприклад, пролонгована активація пост-інфарктного запалення підвищує активність протеаз та асоціюється із надмірною дилатацією [109], в той час як підвищена

депозиція матриксу спричиняє жорсткість шлуночка та діастолічну дисфункцію [110]. Пацієнти із масивним ремоделюванням міокарда мають вищий ризик виникнення аритмій, СН та раптової смерті після ІМ [100].

Незважаючи на те, що в останні десятиліття в усьому світі велика увага приділялася розробці ефективних терапевтичних стратегій, які призвели до зниження загальної захворюваності та смертності у діабетиків після гострого ІМ, залишається достовірна різниця у показниках захворюваності та смертності між пацієнтами з та без ЦД.

Із кожним роком рівень виживання пацієнтів після ІМ зростає, проте спостерігається тенденція до підвищеної поширеності СН [111]. Це обумовлено тим, що сучасні підходи до ІМ є переважно паліативними та не спрямовані на попередження фундаментальної проблеми – ремоделювання міокарда [112].

Отже, реверсування ремоделювання міокарда є ключовою терапевтичною стратегією, щоб сповільнити прогресування СН та зменшити смертність внаслідок ІМ [98]. Тому на сьогодні надзвичайно актуальним залишається пошук препаратів, які здатні попередити або зменшити зміни міокарда, що виникають у відповідь на стресові впливи як адаптивні реакції, проте, врешті, призводять до кардіальної дисфункції. Крім того, важливим завданням є дослідження ефектів лікарських препаратів на різноманітні молекулярні мішені, що залучені у процеси ремоделювання міокарда.

1.2.3 Кардіальна автономна нейропатія у пацієнтів із цукровим діабетом

Кардіальна автономна нейропатія (КАН) є доволі частим ускладненням ЦД, що має значимий вплив на якість життя та асоціюється із несприятливим прогнозом [113]. Виникнення цієї патології серед діабетиків корелює із віком, тривалістю ЦД, ступенем ожиріння та курінням [114].

Автономна нервова система представлена симпатичною та парасимпатичною частинами, які контролюють частоту серцевих скорочень, серцевий викид, скоротливість та електрофізіологію міокарда, звуження та

розширення судин. КАН спричинена пошкодженням автономних нервових волокон, що іннервують серце та кровоносні судини, а це призводить до важких порушень серцево-судинної динаміки [10]. Гіперглікемія вважається пусковим механізмом таких патологічних змін [115].

На початкових етапах захворювання відбувається ураження блукаючого нерва. Як наслідок, виникає тахікардія у стані спокою, адже при таких умовах серце зазнає надмірного впливу симпатичної нервової системи. Підвищена частота серцевих скорочень утримується навіть вночі, тому пацієнти із КАН більш схильні до розвитку гіпертрофії міокарда та кардіальної дисфункції [11].

З часом, приблизно через 5 років, тахікардія зменшується, оскільки пошкоджуються і адренергічні нерви, але частота серцевих скорочень залишається вищою, ніж у популяції загалом. Додатково відбувається маніфестація таких симптомів, як порушення толерантності до фізичних навантажень, ортостатична гіпотензія та надмірне обмеження варіабельності серцевого ритму. До того ж погіршується сприйняття серцевого болю через пошкодження чутливих нервів, тому симптоми «німої» ішемії міокарду не розпізнаються пацієнтом вчасно [12].

У пацієнтів із діабетичною КАН надмірна симпатична стимуляція веде до активації ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, що, попри тахікардію, сприяє зростанню периферичного судинного опору [116]. Поєднання симпатичної гіперактивності та регіональної симпатичної денервації у міокарді провокує зменшення резерву коронарного кровотоку та діастолічної, а згодом і систолічної дисфункції [114].

Відомо, що кардіальна денервація на початкових етапах може бути реверсованою, тому рання діагностика та вчасне лікування можуть покращити прогноз пацієнта [117]. Оптимізація метаболічного профілю вважається єдиною ефективною стратегією лікування діабетичної КАН [118]. Оскільки компенсація ЦД досягається далеко не в усіх пацієнтів, є необхідність у пошуку лікарського засобу, який би зменшував прояви КАН, зокрема, протидіючи надмірним впливам симпатичної нервової системи.

1.3 Кардіопротективні ефекти метформіну та механізми їх реалізації

Метформін чинить свої ефекти шляхом активації АМФ-активованої протеїнкінази, яка інтенсивно експресується не тільки в печінці, але і в інших тканинах, зокрема, у скелетних м'язах, міокарді, а також у кишечнику [119].

Метформін інгібує оксидативний стрес і запалення як прямо, так і опосередковано. Більше того, він зменшує метаболічне перевантаження клітин та індуковане інсулінорезистентністю запалення у тканинах і діє безпосередньо на моноцити, гальмуючи їх диференціювання у макрофаги [120–122].

Метформін пригнічує прозапальні реакції макрофагів [120–122] і сприяє їх диференціації до протизапального функціонального фенотипу [123]. Препарат інгібує маркери запалення, запобігаючи супутньому підвищенню оксидативного метаболізму [124]. Зменшення продукції реактивних форм кисню пов'язане із гальмуванням протеїнкінази С [125] і комплексу 1 респіраторного дихального ланцюга [126].

Наявні дані, що метформін може втручатися у ренін-ангіотензин-альдостеронову систему, індукуючи АМРК, внаслідок чого пригнічується синтез ангіотензину II. Крім того, препарат знижує фіброгенез через зменшення продукції цитозолем активних форм кисню [127]. При індукованій ангіотензином II гіпертрофії культивованих кардіоміоцитів метформін проявляє антигіпертрофічні властивості [128].

У своєму дослідженні Evans et al. продемонстрували, що у пацієнтів із ЦД 2 типу та СН, які приймали метформін або його комбінацію із препаратами сульфонілсечовини, спостерігався значно нижчий рівень смертності, у порівнянні із тими, хто отримував монотерапію препаратами сульфонілсечовини [129]. Інша група вчених Aguilar et al. підтвердила, що виживання пацієнтів, які отримували терапію метформіном, було істотно вищим [130]. У своєму дослідженні Romero та співавтори [131] продемонстрували, що у пацієнтів із ЦД та СН лікування метформіном асоціюється із нижчими рівнями смертності та госпіталізації.

Мета-аналіз когортних досліджень підтвердив, що метформін, порівняно із іншими гіпоглікемізуючими препаратами, характеризується зниженням рівня смертності та кількості госпіталізацій серед пацієнтів, хворих на ЦД із СН, різними класами дисфункцій нирок та показниками фракцій викиду [132].

Дослідження UKPDS показало, що лікування метформіном, попри схожі із іншими цукрознижуючими засобами показники глікемічного контролю, асоціюється зі зменшенням рівня загальної смертності та смерті від ЦД, а також із нижчим ризиком ІМ [15]. Важливим є той факт, що позитивний вплив метформіну утримувався навіть через 10 років після проведення досліджень [37]. У дослідженні SPREAD-DIMCAD виявлено, що пацієнти із ЦД 2 типу та кардіоваскулярними захворюваннями, ліковані метформіном, мали на 46 % менший показник серцево-судинних ускладнень, порівняно із тими, хто отримував гліпізид [133].

Відомо, що у пацієнтів із ЦД 2 типу тривале застосування метформіну у максимальних дозах (2,5-3 г) сприяє схудненню [134]. Проте дані щодо впливу метформіну на масу тіла у пацієнтів без діабету є досить суперечливими [135–137]. Тому це питання потребує подальшого вивчення.

Мета-аналізи спостережних досліджень підтверджують, що метформін пов'язаний із зниженим ризиком ІМ, порівняно із препаратами сульфонілсечовини [138]. Декілька експериментів, які проводилися як на ізольованих серцях, так і на інтактних тваринах [139–141], показали, що лікування метформіном зменшує розмір зони інфаркту. У хворих із ЦД та гострим ІМ, які отримували метформін, порівняно із нелікованими метформіном пацієнтами, спостерігали зниження пікових значень маркерів смертності кардіоміоцитів. Це ж дослідження показало, що в пацієнтів із ЦД 2 типу, які отримували метформін, розміри зон інфаркту були меншими, ніж у пацієнтів без ЦД, які не приймали препарат [142].

Проте у інших дослідженнях кардіопротективні ефекти метформіну не були підтверджені [143,144].

Здатність метформіну пригнічувати синтез протеїнів у кардіоміоцитах [145], зменшувати серцеву масу та експресію прогіпертрофічних цитокінів свідчить про його терапевтичну ефективність при кардіальній гіпертрофії [146]. Здатність метформіну зменшувати ізопротеренол-індуковану гіпертрофію кардіоміоцитів було підтверджено морфометрично. Крім того, метформін зменшував підвищену ізопротеренолом експресію профібротичних генів [146].

Група дослідників Hu M. et al. [147] у своєму *in vitro* дослідженні виявили, що метформін у низькій дозі (5 ммоль/л) захищає H9C2 клітини (кардіоміоцити ембріонів щурів) від ушкодження, викликаного гіпоксією та гіперглікемією. Кардіопротективний ефект препарату *in vitro* був реалізований через АМФК/JNK-залежний механізм.

Хоча більшість досліджень показують, що метформін проявляє свої кардіопротективні властивості шляхом активації АМФ-активованої протеїнкінази [140,148], доведено, що наявні інші потенційні механізми дії препарату, незалежні від цього ферменту [16].

У літературі описано, що метформін діє в ендотеліальних клітинах [149,150], в гепатоцитах [151], в клітинах злоякісних пухлин ендометрію шляхом регуляції активності транскрипційного білка forkhead box O1 (FoxO1), який кодується однойменним геном [152]. Встановлено також, що FoxO1 відіграє неабияку роль у підтримці кардіального гомеостазу [153].

FoxO – група протеїнів, що включає FoxO1, FoxO3a, FoxO4 та FoxO6, які забезпечують різноманітні фізіологічні та патологічні функції, регулюючи експресію генів, пов'язаних із апоптозом, зупинкою клітинного циклу, репарацією пошкодженої ДНК, метаболізмом глюкози, стійкістю до оксидативного стресу та іншими функціями [154,155].

Отже, на сьогодні залишається актуальним питання вивчення кардіопротективних властивостей препарату метформін, оскільки наявні дані проведених досліджень є часто суперечливими, а лікарський засіб залишається препаратом вибору для лікування ЦД 2 типу. В літературі не вказано єдиної

ефективної кардіопротективної дози препарату для застосування *in vitro* та *in vivo*. Механізми, завдяки яким метформін проявляє свої захисну дію на кардіоміоцити, потребують подальшого дослідження. Особливу увагу варто приділяти впливу метформіну на молекулярні мішені та сигнальні шляхи, залучені у процеси ремоделювання міокарда, зокрема, на експресію фетальних генів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальна частина дослідження проведена *in vitro* та *in vivo*.

In vitro частина експериментів виконана із використанням культури H9C2 клітин (кардіоміобласти ембріонів щурів). Експерименти *in vivo* здійснені на мишах-самцях дикого типу C57Bl/6J та на щурах лінії «Вістар». Дизайн дослідження наведено на рис 2.1 (*in vitro*) та рис 2.2 (*in vivo*).

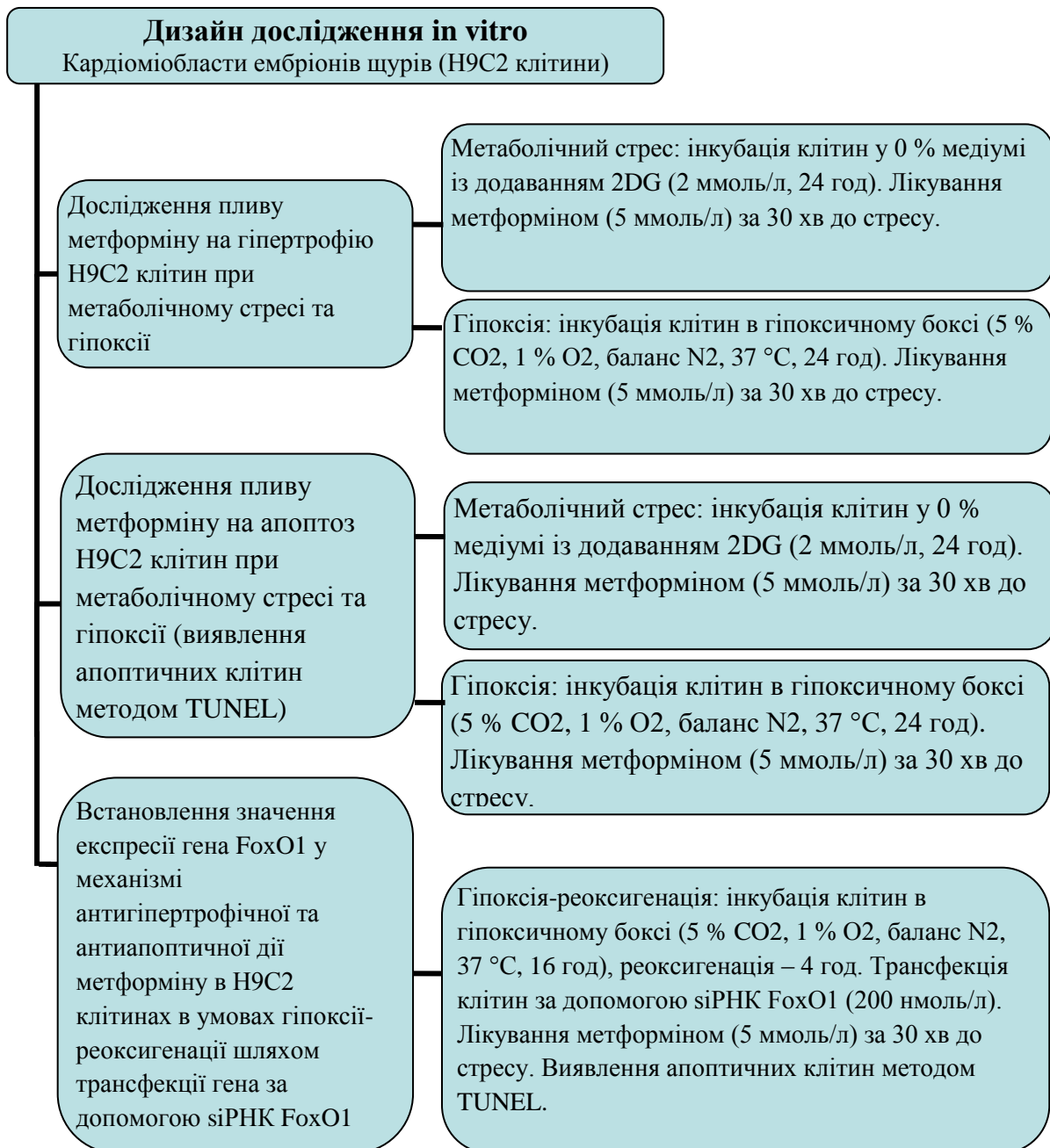


Рисунок 2.1 Дизайн дослідження *in vitro*

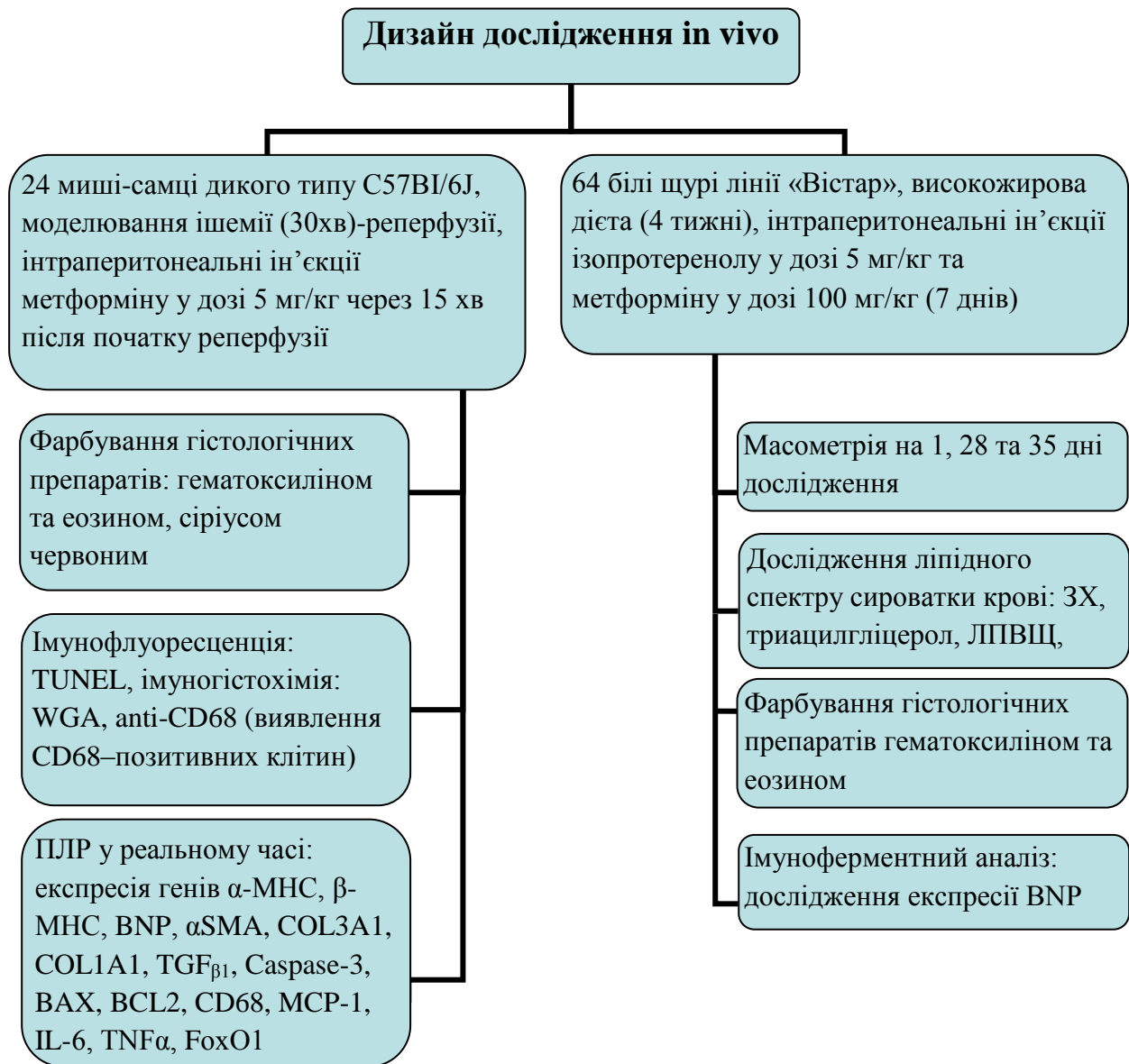


Рисунок 2.2 Дизайн дослідження in vivo

2.1 Культивування клітинної культури

In vitro частина експериментів проведена на H9C2 культурі клітин. Клітинна лінія H9C2 отримана з ембріональної тканини шлуночків, що є надзвичайно важливим фактором, оскільки основні патологічні зміни виникають переважно у міокарді лівого шлуночка. Неонатальні кардіоміоцити щурів імітують широкий спектр гіпертрофічних ознак і мають великі перспективи для аналізу функції кардіоміоцитів in vitro [156].

H9C2 клітини (ATCC, Manassas, VA, USA) культивовані у живильному середовищі Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies), збагаченому фетальною сироваткою телят у кінцевій концентрації 10 % (Fetal Bovine Serum, Life Technologies), з додаванням пеніцилін-стрептоміцинової суміші (Penicillin-Streptomycin 10,000 Од/мл, Life Technologies) в CO₂-інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % CO₂ і вологості повітря 95 %. Кожні 48 год проводили заміну ростового середовища на свіже.

Коли конфлюентність сягала 70-80 %, здійснено пасажі клітин. Для цього клітини двічі промиті фосфатно-сольовим буфером (phosphate buffered saline, PBS), який готували у розрахунку 1 таблетка (Gibco™ PBS Tablets) на 500 мл дистильованої води. Потім клітини покривали трипсином (Trypsin-EDTA, Gibco), поміщали в CO₂-інкубатор і через 1-2 хв, переконавшись, що всі клітини від'єдналися від дна, додавали медіум із сироваткою, щоб інактивувати трипсин. Після цього здійснили їх пасаж у відповідний до дизайну експерименту посуд (Cell Culture Plates, Petri Dishes, Cell Culture Tubes, Thermo Fisher) із живильним середовищем та продовжили їх культивування у CO₂-інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % CO₂ і вологості повітря 95 % до досягнення необхідної для експерименту конфлюентності.

2.1.1 Методика індукування стресу, його корекція та виявлення гіпертрофії

Експерименти розпочинали, коли конфлюентність клітин після пасажу становила 70 %.

Елімінація сироватки із медіуму забезпечує кращі умови для проведення експериментів [157], тому перед кожним дослідом проведено депривацію клітин.

Щоб здійснити депривацію, живильне середовище замінене на Dulbecco's Modified Eagle's medium із пеніцилін-стрептоміциновою сумішшю, але без додавання сироватки (0 % medium). В таких умовах H9C2 клітини інкубувалися

упродовж 24 год у CO₂-інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % CO₂ і вологості повітря 95 %.

Після 24 год депривації за 30 хв до стресу, у живильне середовище введено метформін (Metformine Zentiva, Sanofi-aventis, France) у кінцевій концентрації 5 ммоль/л.

Щоб викликати гіпоксію, клітини поміщені у гіпоксичний бокс, Biospherix, (5 % CO₂, 1 % O₂, баланс N₂) при 37 °C на 24 год. Метаболічний стрес індукували інкубацією клітин у 0 % медіумі із додаванням 2-деокси-d-глюкози (2DG) (Merck) у кінцевій концентрації 2 ммоль/л упродовж 24 год.

Після закінчення експерименту клітини двічі промиті розчином PBS та зафіксовані за допомогою 4 % розчину параформальдегіду (Santa Cruz Biotechnologies) при кімнатній температурі.

Випадковим чином обрано та сфотографовано по 3 поля зору у кожній лунці із клітинами за допомогою камери Leica DFC9000 GT sCMOS на мікроскопі Leica Dmi8 (Leica Microsystems, France). Площу клітин визначали за допомогою програми ImageJ.

2.1.2 Виявлення апоптичних клітин за допомогою методики TUNEL

Щоб виявити апоптичні клітини, використано набір реактивів Dead End Fluorometric TUNEL system та виконано протокол відповідно до інструкції виробника (Promega).

Клітини зафіксовані за допомогою свіжоприготовленого вільного від метанолу 4 % розчину формальдегіду у PBS (pH 7.4) при 4 °C упродовж 25 хв (300 мкл на 1 лунку). Після двох промивань у PBS (500 мкл на 1 лунку) по 5 хв при кімнатній температурі клітини покриті 0.2 % розчином Triton® X-100 у PBS (50 мкл на 1 лунку) протягом 5 хв, після чого промивання повторювали двічі по 5 хв.

На поверхню клітин нанесено Equilibration Buffer (100 мкл на 1 лунку) упродовж 10 хв при кімнатній температурі. За цей час приготовано rTdT incubation buffer з розрахунку 50 мкл на 1 лунку (для експерименту ми використовували планшети на 24 лунки). Для цього було змішано Equilibration Buffer, Nucleotide Mix та rTdT Enzyme (45 мкл, 5 мкл, 1 мкл відповідно з розрахунку на 1 лунку). Всі наступні етапи експерименту проведенні в умовах обмеженого попадання світла.

Опісля видалення Equilibration Buffer нанесений rTdT incubation buffer, а поверхня клітин заделегідь вкрита приготованим відповідно до величини лунок пластиком, включеним у набір. Планшет із клітинами, обгорнутий алюмінієвою фольгою, помістили на 1 год в CO₂-інкубатор при 37 °C.

Через 1 год пластик видалений, а клітини вкриті розчином 2X SSC (50 мкл на 1 лунку), який приготували шляхом розведення стандартного реактиву 20X SSC деіонізованою водою у пропорції 1:10. Тривалість даного етапу – 15 хв при кімнатній температурі. Далі клітини тричі промиті PBS по 5 хв при кімнатній температурі.

Після промивання на клітини нанесено DAPI (Vector Lab), попередньо розведений у розрахунку 1:1000, (50 мкл на 1 лунку) на 15 хв. Далі – тричі здійснено промивання деіонізованою водою та покрито клітини в лунках скельцями за допомогою Mowiol (Merck, клей-медіум, який застосовується для експериментів, що супроводжуються імунофлюоресценцією).

Клітини візуалізовані за допомогою імунофлюоресцентного мікроскопа (Leica Dmi8) із застосуванням стандартного флюоресцеїнового фільтра. Fluorescein-12-dUTP забарвлює лише апоптичні клітини (світяться зеленим кольором), а DAPI – ядра всіх наявних клітин у блакитний колір.

Випадковим чином було обрано та сфотографовано по 3 поля зору у кожній лунці із клітинами за допомогою камери Leica DFC9000 GT sCMOS на мікроскопі. Підрахувавши загальну кількість клітин та кількість апоптичних клітин, вираховано відсоток останніх у кожній групі клітин.

2.1.3 Методика проведення трансфекції клітин

Для розчинення реактивів використано Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Life Technologies). Трансфекція клітин здійснена з використанням Lipofectamine 2000 transfection reagent (Life Technologies) у кінцевій концентрації 2 мкг/мл відповідно до інструкції виробника та малої інтерферуючої РНК FoxO1 (siРНК FoxO1) або siРНК негативний контроль (siРНК negative control) (Life Technologies) в кінцевій концентрації 200 нмоль/л.

За день до трансфекції клітини розсаджені на 24-лункових планшетах із додаванням повного медіуму (400 мкл на лунку) без антибіотиків, оскільки вони зменшують ефективність процедури. На момент трансфекції конфлюентність клітин сягла 60 %. Приготовано комплекси siРНК-Lipofectamine™ 2000 в розрахунку на 1 лунку:

- розчинено 1 мкл Lipofectamine 2000 (концентрація стокового розчину 1 мг/мл) в 50 мкл Opti-MEM Medium та інкубувано 15 хв при кімнатній температурі;
- розчинено 5 мкл siРНК (концентрація стокового розчину 20 мкмоль/л) в 50 мкл Opti-MEM Medium;
- змішано приготовлені розчини у співвідношенні 1:1 (загальний об'єм 106 мкл) та інкубувано при кімнатній температурі упродовж 15 хв, щоб сформувався комплекс;
- 106 мкл комплексу siРНК-Lipofectamine 2000 додано в кожну лунку з клітинами та повним медіумом без антибіотиків.

Після додавання комплексу siРНК-Lipofectamine™ 2000 клітини поміщали в CO₂-інкубатор і культивували при 37 °С в атмосфері 5 % CO₂ і вологості повітря 95 %. Через 24 год проводилась заміна живильного середовища, яке містило комплекс siРНК-Lipofectamine™ 2000, на DMEM, збагачений сироваткою з додаванням пеніцилін-стрептоміцинової суміші.

Після 24 год подальшої інкубації конфлюентність клітин сягала 80-90 %, вони були готові до наступних експериментів.

Щоб викликати гіпоксію, клітини поміщали у гіпоксичний бокс (1 % O₂) при 37 °C на 16 год із подальшою реоксигенацією протягом 4 год.

Випадковим чином обрано та сфотографовано по 3 поля зору у кожній лунці із клітинами за допомогою камери Leica DFC9000 GT sCMOS на мікроскопі Leica Dmi8. Площу клітин визначали за допомогою програми ImageJ. Щоб виявити апоптичні клітини, використано набір реактивів DeadEnd Fluorometric TUNEL system та виконано протокол відповідно до інструкції виробника (Promega).

Ефективність трансфекції підтверджено за допомогою ЗТ-ПЛР в реальному часі.

2.2 Дослідження на тваринах та експериментальні протоколи

2.2.1 Моделювання ішемії-реперфузії у мишей

Дослідження відповідає міжнародним вимогам (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health, NIH Publication No. 85-23, revised 1985) і виконано відповідно до рекомендацій для використання тварин у лабораторних умовах (French Accreditation of the Laboratory Animal Care approved by the local Centre National de la Recherche Scientific ethics committee).

Тримісячні миші-самці дикого типу C57Bl/6J із вихідною масою 19-24 г, отримані із Janvier Labs, утримувалися у приміщенні із контрольованою температурою (25 °C) із дотриманням природного циклу день /ніч, стандартної дієти та необмеженого доступу до води. Тварин випадковим чином поділено на 4 групи (табл. 2.1)

Таблиця 2.1- Розподіл мишей на групи

| Група тварин | Умови досліджу |
|----------------|--|
| С n=6 | здійснено ліву парастернотомію, ішемію не змодельовано, тварини отримували ін'єкції PBS |
| С + М n=6 | здійснено ліву парастернотомію, ішемію не змодельовано, тварини отримували ін'єкції метформіну |
| I/R n=6 | здійснено ліву парастернотомію та змодельовано ішемію/реперфузію, тварини отримували ін'єкції PBS |
| I/R + М n=6 | здійснено ліву парастернотомію та змодельовано ішемію/реперфузію, тварини отримували ін'єкції метформіну |

Протокол операції. Хірургічне моделювання ішемічно-реперфузійного ураження серця проводили з дотриманням правил асептики. Під час операції миші були інтубовані та поміщені під штучну вентиляцію. Загальна анестезія здійснена за допомогою інтраперитонеальних ін'єкцій кетаміну (125 мг/кг) та ксилазину (10 мг/кг). Доступ до серця здійснений за допомогою лівої парастернотомії, на ліву передню низхідну коронарну артерію накладено 0.4 мм поліетиленовий шов. Лігатура накладена на шов, і регіональна ішемія міокарда здійснена шляхом затягування лігатури. Після 30 хв ішемії оклюзивний шов знятий, що розпочало реперфузію. Миші у контрольній групі проходили ту ж процедуру, за винятком затягування лігатури.

Через 15 хв реперфузії прооперованим тваринам здійснені інтраперитонеальні ін'єкції метформіну (Metformine Zentiva, Sanofi-aventis, France) у дозі 5 мг/кг або PBS у кінцевому об'ємі 100 мкл. Таке лікування тривало упродовж 14 днів.

На 15 день після операції проведено цервікальну дислокацію за методикою, описаною у AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. Для досліджень відібрано і заморожено в рідкому азоті кров і шматки

тканини серця. Тканина верхівки серця використана для визначення експресії генів. Кріосекція (товщина зразків 10 мкл) здійснена за допомогою кріотома Microm Cryostar NX50. Отримані матеріали використано для проведення гістологічних, імуногістохімічних досліджень та ПЛР.

2.2.2 Моделювання ізопротеренолової кардіоміопатії

З метою реалізації поставлених завдань проведено досліди на 64 білих статевозрілих щурах-самцях породи Вістар віварію Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України. Умови утримання тварин відповідали правилам, які рекомендовані Європейською конвенцією із захисту хребетних тварин, що використовуються для наукових цілей (Страсбург, 1986).

Досліди проводили відповідно до положень GLP (1981 р.), правил проведення робіт із використанням експериментальних тварин (1977 р.), Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях від 18.03.1986 р., Директиви ЄЄ № 609 від 24.11.1986 р. і наказу МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р., Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 14.03.2006 р., етичного кодексу ученого України (2009 р.) та вимог комісії з біоетики ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України» (протокол № 15 від 8.01.2013 р.).

Експериментальних тварин з вихідною масою близько 200 г рандомізували методом випадкової вибірки. Всі піддослідні тварини були спочатку поділені на 2 групи: тварини у першій групі отримували стандартну дієту, а у другій – високожирову дієту (HFD), яка базувалась на формулі № D12451 (Research Diets, New Brunswick, NJ), що пропонує наступний склад раціону: 45 % жирів, 20 % білка, 35 % вуглеводів, 19.7 кДж/г, та тривала упродовж 4 тижнів до та ще 1 тиждень під час моделювання ураження серця і введення метформіну.

Після 4 тижнів від початку експерименту кожна група тварин випадковим чином поділена на 4 підгрупи. В результаті ми отримали 8 груп щурів, з якими проведені подальші дослідження (табл. 2.2).

Таблиця 2.2 – Розподіл щурів на групи

| | |
|-----------------------|---|
| C n=6 | контрольна група, тварини отримували стандартну дієту та інтраперитонеальні ін'єкції фізрозчину |
| C + M n=6 | тварини отримували стандартну дієту та інтраперитонеальні ін'єкції метформіну |
| Iso n=10 | тварини отримували стандартну дієту та інтраперитонеальні ін'єкції ізопротеренолу |
| Iso + M n=10 | тварини отримували стандартну дієту та інтраперитонеальні ін'єкції ізопротеренолу та метформіну |
| HFD n=6 | тварини отримували високожирову дієту та інтраперитонеальні ін'єкції фізрозчину |
| HFD + M n=6 | тварини отримували високожирову дієту та інтраперитонеальні ін'єкції метформіну |
| HFD + Iso n=10 | тварини отримували високожирову дієту та інтраперитонеальні ін'єкції ізопротеренолу |
| HFD + Iso + M n=10 | тварини отримували високожирову дієту та інтраперитонеальні ін'єкції ізопротеренолу та метформіну |

Кардіоміопатію моделювали шляхом інтраперитонеального введення ізопротеренолу (Isoprenaline hydrochloride, Sigma Aldrich) у дозі 5 мг/кг (у фінальному об'ємі 2 мл/кг) або фізрозчину в дозі 2 мл/кг упродовж 7 днів. Через 8 год після ін'єкцій ізопротеренолу тварини отримували інтраперитонеально метформін (Фармак) у дозі 100 мг/кг (у кінцевому об'ємі 2 мл/кг) або фізрозчин в дозі 2 мл/кг упродовж 7 днів.

У результаті моделювання кардіоміопатії летальні ураження виникли в 2 тварин із групи Iso (стандартна дієта та інтраперитонеальні ін'єкції ізопротеренолу). При розтині та огляді загиблих тварин виявлено масивні зони некрозу в тканинах міокарду, інші органи – ішемізовані, однак без видимих змін.

Кровопускання тварин проводили під загальним знечуленням тіопенталом натрію (інтраперитонеальне введення з розрахунку 40 мг/кг маси тіла тварини). Об'єктом дослідження були серце та сироватка крові. Отримані матеріали використано для проведення гістологічних, біохімічних досліджень та імуноферментного аналізу.

2.3 Морфогістологічні дослідження

Протокол забарвлення тканин за допомогою гематоксиліну та еозину: зрізи після нанесення на предметні скельця інкубовані в термостаті при температурі 40–57 °С, далі – занурені у ксилол на 2 хв. Після просушування на повітрі упродовж 30 сек скельця занурені у спирт 96 % на 5 хв, промиті у дистильованій воді та забарвлені гематоксиліном. Після 2 промивань у дистильованій воді і просушування фільтрувальним папером, проведено інкубацію з водним розчином еозину 1 % протягом 60 сек, із наступним промиванням в дистильованій воді, просушуванням фільтрувальним папером. Зразки занурені у спирт 96 % на 30 сек, далі – у ксилол II – до просвітлення. Нанесено канадський бальзам та покривне скельце.

Протокол забарвлення тканин пікро-сиріусом червоним (набір реактивів Picro Sirius Red Stain Kit (Connective Tissue Stain, ab150681), Abcam).

Зразки міокарда розморожені при кімнатній температурі, промиті у PBS та зафіксовані за допомогою 4% параформальдегіду. Зрізи тканини повністю покриті пікро-сиріус червоним розчином (Picro-Sirius Red Solution) із наступною інкубацією упродовж 60 хв. Після цього секції промиті двічі у розчині оцтової кислоти, далі – у 96 % етанолі. Дегідратацію проведено

шляхом двох занурень предметних скелець у 96% етанолі. Зафарбовані зрізи міокарда покрито скельцями.

2.4 Імуногістохімічні дослідження

2.4.1 Протокол імуногістохімічного дослідження для виявлення CD68–позитивних клітин

Для CD68 імунофлюоресценції використано первинні (Anti-CD68 [FA-11], MCA1957GA, Bio-Rad) та вторинні (Goat Anti-Rat IgG H&L, AlexaFluor® 568) антитіла. Дослідження проведене згідно з протоколом, рекомендованим Bio-Rad.

Зразки кріосекцій розморожені при кімнатній температурі (1 год), зафіксовані у сухому ацетоні (15 хв) з подальшим випаровуванням (10 хв) і промиті двічі по 5 хв у 0,025 % розчині Triton X-100 у сольовому трис буфері (TBS), щоб зменшити поверхневий натяг та уникнути неспецифічного забарвлення.

Далі проведено інкубацію у 10 % козячій сироватці із 1 % розчином альбуміну бичачої сироватки (BSA) у TBS упродовж 2 год при кімнатній температурі. Після видалення надлишку рідини навколо секції за допомогою серветки, застосоване первинне антитіло Anti-CD68, розчинене у TBS із 1 % BSA (1:300) та здійснено інкубацію при 4 °C упродовж 18 год.

Після промивання двічі по 5 хв у 0,025 % розчині Triton X-100 у TBS додано вторинне антитіло – Goat Anti-Rat IgG, розчинене у TBS із 1 % BSA (1:500), та інкубовано упродовж 1 год при кімнатній температурі із обмеженим доступом світла. Після промивання тричі по 5 хв за допомогою TBS, секції покриті скельцями з використанням клею Mowiol та візуалізовані за допомогою імунофлюоресцентного мікроскопа (Leica Dmi8).

2.4.2 Протокол імуофлюоресцентного дослідження за допомогою аглютиніну із зародків пшениці (WGA)

Дослідження виконано за допомогою Oregon Green® 488 кон'югату (Invitrogen) на серцевих криосекціях товщиною 10мкм:

Зразки криосекцій розморожені при кімнатній температурі та зафіксовані у сухому ацетоні упродовж 15 хв і промиті розчином PBS. Після просушування скельця секція обведена за допомогою Dako Pen, щоб попередити розтікання реактивів.

Зразки пермеабілізовані у 0.2 % розчині TritonX-100 у PBS упродовж 20 хв, промиті і для попередження неспецифічного зв'язування заблоковані за допомогою 1 % PBS-BSA (Thermo Fisher Scientific) упродовж 40 хв при кімнатній температурі;

Проведено інкубацію із первинним кролячим антитілом (Fluorescein/Oregon Green Polyclonal Antibody, Alexa Fluor 488, Invitrogen), розчиненим у PBS-BSA (1:300), протягом 2 год при кімнатній температурі у темному приміщенні.

Після 2 промивань зразки інкубовані із вторинним антитілом (Goat anti-Rat IgG, Oregon Green 488, Invitrogen) розчиненим у PBS-BSA (1:500), протягом 2 год, та по завершенню інкубації зафарбовані з допомогою DAPI (Vector Lab), попередньо розведеному у розрахунку 1:1000, упродовж 15 хв і покриті клеєм MOWIOL і скельцями.

2.5 Методика виділення тотальної РНК та проведення полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі

2.5.1 Протокол виділення тотальної РНК із H9C2 клітин і тканин серця

Загальна РНК була отримана із сердець мишей та Н9С2 клітин із використанням GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit відповідно до інструкції виробника:

Підготовка Н9С2 клітин. Клітини вирощені у чашках Петрі діаметром 6 см, живильне середовище аспіроване. Проведено лізис клітин та інактивацію РНази: клітини покриті 250 мкл лізисного розчину (Lysis Solution/2-ME Mixture), через 2 хв зібрано лізат. Фільтрацію лізату здійснено через фільтраційну колонку, поміщену у пробірку для збору зразків об'ємом 2 мл шляхом 2-хвилинного центрифугування при максимальній швидкості, після чого її видалено. До відфільтрованого лізату добавлено 250 мкл 70 % розчину етанолу та ретельно змішано за допомогою вортексу.

Підготовка заморожених тканин серця. Швидко, щоб уникнути розмороження та руйнування РНК, відрізано та відважено шматочки тканин масою до 40 мг. Проведено лізис тканин та інактивацію РНази шляхом додавання 300 мкл лізисного розчину (Lysis Solution/2-ME Mixture) і гомогенізацію за допомогою Brinkman Polytron PT 1200 гомогенайзера. До гомогенізованих тканин добавлено 590 мкл очищеної від РНази води та 10 мкл розчину протеїнази К, ретельно перемішано та інкубовано при температурі 55 °С упродовж 10 хв. 700 мкл лізату пропущено через фільтраційну колонку, поміщену у пробірку для збору зразків об'ємом 2 мл, відцентрифуговано при максимальній швидкості; після чого фільтрат переміщений у нову мікроцентрифужну тубу, і процедуру повторено із відфільтрованим залишком. До відфільтрованого лізату добавлено 450 мкл 100 % етанолу та ретельно змішано за допомогою вортексу.

Ізоляція РНК (даний етап спільний для клітин і тканин). Суміш лізату та етанолу нанесено на з'єднувальну колонку, яка поміщена у пробірку для збору зразків об'ємом 2 мл, та центрифуговано упродовж 15 секунд; рідину із пробірки вилучено, а з'єднувальну колонку поміщено назад у пробірку. У піпетку набрано 500 мкл промиваючого розчину 1 (Wash Solution 1), нанесено на колонку та відцентрифуговано упродовж 15 секунд. З'єднувальну колонку

переміщено у нову пробірку, за допомогою піпетки 500 мкл промиваючого розчину 2 (Wash Solution 2), попередньо змішаного із абсолютним етанолом у співвідношенні, нанесено на колонку та відцентрифуговано упродовж 15 секунд, а відфільтровану рідину видалено. За допомогою піпетки наступні 500 мкл промиваючого розчину 2 (Wash Solution 2) нанесено на колонку та відцентрифуговано упродовж 2 хв. З'єднувальну колонку переміщено у свіжу пробірку; на неї нанесено 50 мкл очищувального розчину (Elution Solution) та відцентрифуговано упродовж 1 хв. Очищена РНК, що знаходилася у очищувальному розчині, використана для проведення ПЛР у реальному часі із зворотною транскрипцією.

2.5.2 Протокол проведення зворотної транскрипції

Зворотна транскрипція загальної РНК (500 нг) у кДНК здійснена за допомогою набору High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™) у присутності випадкових гексамерів відповідно до інструкції виробника. Приготовано 2х RT master mix згідно із інструкцією (на 20 мкл). Піпеткою відібрано по 10 мкл 2х RT master mix та внесено у лунки. Зразки РНК в об'ємах по 10 мкл ретельно змішано із 2х RT master mix, проведено їх центрифугування упродовж 10 сек. Ампліфікатор запрограмовано відповідно до вказівок у інструкції для набору High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (табл. 2.3), налаштовано об'єм реакції на 20 мкл, планшет встановлено у ампліфікатор та розпочато термальне циклування.

Таблиця 2.3 – Параметри для програмування ампліфікатора

| Налаштування | Крок 1 | Крок 2 | Крок 3 | Крок 4 |
|--------------|--------|--------|--------|---------------|
| Температура | 25 °C | 37 °C | 85 °C | 4 °C |
| Час | 10 хв | 120 хв | 5 хв | Підтримування |

2.5.3 Методика проведення полімеразно-ланцюгової реакції в режимі реального часу

Для визначення рівня експресії досліджуваних генів проведено ЗТ-ПЛР реальному часу за допомогою методу відносної стандартної кривої з використанням набору TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems TM) на приладі StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems TM) відповідно до інструкцій виробника. Специфічні набори прямих і зворотних праймерів із зондом Assay Mix для кожного гена виготовлені та замовлені в Applied Biosystems Store. Порядок прямого та зворотного праймерів для досліджуваних генів було підбрано за допомогою програмного забезпечення Primer-BLAST (NIH, США). Об'єми реагентів, що використовувалися для наступних етапів ПЛР, були розраховані за допомогою системного забезпечення StepOne™ software. Експресія цільової мРНК була нормалізована до експресії мРНК GAPDH (гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогеназа).

Основні етапи проведення експерименту відносної стандартної кривої:

а) дизайн експерименту: прилад StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) програмований відповідно до умов проведення експерименту:

- 1) створено новий експеримент (згідно з інструкцією);
- 2) визначено властивості експерименту: назва – Relative Standard Curve ExAMФle, інструмент – StepOnePlus™ Instrument (96 Wells), тип експерименту – Quantitation;
- 3) вказано методи та матеріали: метод – Relative Standard Curve, реагенти – TaqMan® Reagents, швидкість – Fast (~ 40 хв), матриця для реплікації – комплементарна ДНК (сDNA, 2-step RT-PCR);
- 4) налаштовано мішені: список досліджуваних генів та порядок прямого і зворотного праймерів наведено у додатку Г у напрямку 5'–3';

налаштування здійснено окремо для кожної мішені та ендогенного контролю (GAPDH) згідно із інструкцією;

- 5) налаштовано стандарт: стандартні криві налаштовані для мішеней та ендогенного контролю, для кожної задані параметри: 5 пунктів, 3 повтори, стартова кількість – 200 нг, серійний фактор – 1:10;
- 6) налаштовано зразки: для кожного зразка введено назву (C, IR, IR + M), кількість зразків – 3, кількість повторів – 3, кількість негативних контролів для кожного зразка – 3, інші налаштування згідно стандартних рекомендацій, наведених у інструкції;
- 7) налаштовано відносне кількісне визначення: референсний зразок (вибрано із попередньо налаштованих зразків) – C, ендогенний контроль (вибрано із попередньо налаштованих мішеней) – GAPDH;
- 8) налаштовано метод проведення: Graphical View, об'єм реакції у лунці – 20 мкл, температурний профіль – за замовчуванням;
- 9) огляд налаштувань реакції:
 - заповнено таблиці Reaction Mix Calculations для кожної мішені: Reaction Mix Calculations → обрано назву мішені → Inventoried/Made to Order → Reaction Volume Per Well – 20 мкл → Excess Reaction Volume → 10 % → Reactions Mix Calculations для кожної мішені: Master Mix Concentration 2.0X, Assay Mix Concentration 20,0X, підтверджено компоненти та їх об'єми; Standard Dilution Series для кожної мішені: Standard Concentration in Stock – 200, одиниці за замовчуванням – нг/мкл, підтвердження порохваних об'ємів для приготування серій стандартних розведень;
 - заповнено таблиці Reactions Mix Calculations для GAPDH: Reaction Mix Calculations → GAPDH → Inventoried/Made to Order → Reaction Volume Per Well – 20 мкл → Excess Reaction Volume – 10 % → Reactions Mix Calculations для GAPDH: Master Mix Concentration

2.0X, Assay Mix Concentration 20,0X, підтвердження компонентів та їх об'ємів; Standard Dilution Series для GAPDH: Standard Concentration in Stock – 200, одиниці за замовчуванням – нг/мкл, підтвердження порохованих об'ємів для приготування серій стандартних розведень;

- заповнено таблицю Sample Dilution Calculations: у полі Diluted Sample Concentration (10X for Reaction Mix) введено 5.0 → одиниці за замовчуванням – нг/ мкл → підтверджено пороховані об'єми для розведень зразків;

10) завершено налаштування;

б) приготування реакцій:

- 1) матриця для реплікації (Template): кДНК отримана за допомогою реакції зворотної транскрипції із використанням набору High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™), методику описано вище;
- 2) розведення зразків (Sample Dilutions): об'єми обраховані за допомогою StepOne™ software, у марковані мікроцентрифужні пробірки внесено воду (19 мкл) та зразки (1 мкл), перемішано спочатку за допомогою вортексу, далі – центрифуги;
- 3) серії стандартних розведень (Standard Dilution Series): об'єми води та розчинів стандартів у п'яти розведеннях для кожного досліджуваного зразка та GAPDH обраховані за допомогою StepOne™ software (додаток Д); у попередньо промарковані мікроцентрифужні пробірки внесено воду (5 мкл упершу і по 9 мкл у 4 наступні), далі у першу пробірку додано 5 мкл стокового розчину стандарту (200 нг/мкл), перемішано спочатку за допомогою вортексу, далі – центрифуги; із отриманого розчину № 1 відібрано 1 мкл та додано у другу пробірку, з другої пробірки 1 мкл розчину внесено у третю пробірку, з третьої – в четверту, з четвертої – в п'яту; в результаті отримали серію розведень:

100, 10, 1, 0,1, та 0,01 мкг/мкл. Така процедура проводилася для стандартів кожного досліджуваного зразка та GAPDH;

4) реакційна суміш (Reaction Mix): об'єми реагентів для приготування реакційної суміші для кожного досліджуваного зразка та GAPDH обраховані за допомогою StepOne™ software (додаток E); у попередньо промарковані мікроцентрифужні пробірки внесено реагенти, ретельно перемішано та центрифуговано, щоб уникнути формування бульбашок;

5) планшет для реакцій (Reaction Plate):

- для кожної мішені приготовлено реакції негативного контролю (для трьох повторів): у пробірки внесено по 59,4 мкл реакційних сумішей, приготованих для кожної досліджуваної мішені або GAPDH, та по 6,6 мкл води, ретельно перемішано шляхом піпетування та центрифугування; отриману суміш (негативний контроль) в об'ємі 20 мкл добавлено у відповідні лунки реакційного планшета;
- приготування реакцій зі стандартом: у пробірки внесено по 59,4 мкл реакційного міксу для кожного стандарту та по 6,6 мкл стандарту у 5 розведеннях, ретельно перемішано, центрифуговано та внесено в об'ємі 20 мкл у відповідні лунки реакційного планшета;
- приготування реакцій для кожного досліджуваного зразка: у пробірки внесено по 59,4 мкл реакційного міксу та по 6,6 мкл зразка, ретельно перемішано, центрифуговано та внесено в об'ємі 20 мкл у відповідні лунки реакційного планшета;
- планшет вкритий оптичною плівкою та відцентрифуговано;

в) проведення експерименту відносної стандартної кривої за допомогою ампліфікатора StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems відповідно до стандартних налаштувань, вказаних у інструкції для ампліфікатора;

г) аналіз результатів: StepOne software аналізує отримані результати, використовуючи налаштування за замовчуванням, та відображає їх на екрані.

2.6 Методика проведення імуноферментного аналізу

Дослідження виконане із використанням набору реагентів Rat BNP ELISA Kit (Elabscience) відповідно до інструкції виробника.

Підготовка реагентів. Перед використанням всі реагенти доведені до кімнатної температури, імуноферментний аналізатор налаштований (Microplate reader Multiskan FC-357, Thermo Fisher Scientific) відповідно до вказівок у інструкції. Розчинено 30 мл Concentrated Wash Buffer за допомогою 720 мл дистильованої води, отримано 750 мл Wash Buffer. Відцентрифуговано стандарт протягом 1 хв, додано 1 мл Reference Standard & Sample Diluent, інкубовано при кімнатній температурі упродовж 10 хв; ретельно перемішано за допомогою піпетки із отриманням робочого розчину 2000 пг/мл; далі проведено серійні розведення (градієнт розведення: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 0 пг/мл). У 7 пробірок додано по 500 мкл Reference Standard & Sample Diluent; піпетовано 500 мкл робочого розчину (2000 пг/мл) в першу пробірку з отриманням робочого розчину 1000 пг/мл; 500 мкл якого піпетовано в наступну (повторено для кожної пробірки). Підготовано робочі розчини Concentrated Biotinylated Detection Ab (50 мкл/лунку) та Concentrated HRP Conjugate (100 мкл/лунку) шляхом їх розведення у 100 разів за допомогою Biotinylated Detection Ab Diluent та Concentrated HRP Conjugate Diluent відповідно.

Протокол дослідження. Додано Standard working solution до перших двох колонок; розчин у кожній концентрації додано у двох зразках в окремі лунки, розміщені одна біля одної (50 мкл на лунку); негайно додано в кожну лунку по 50 мкл робочого розчину Biotinylated Detection Ab, накрито

герметиком, доданим у комплекті, інкубовано 45 хв при 37 °С (термошейкер для планшет «PST – 60 HL», Biosan).

Аспіровано розчин із кожної лунки, додано по 350 мкл Wash Buffer в кожну лунку, через 1 – 2 хв повторно аспіровано і профільтровано (повторено тричі). Додано по 100 мкл HRP Conjugate working solution у кожну лунку, накрито герметично пластиною (Plate sealer), інкубовано протягом 30 хв при 37 °С. Аспіровано розчин із кожної лунки і промито п'ять разів.

В кожну лунку додано 90 мкл Substrate Reagent, інкубовано 15 хв при 37 °С, в умовах обмеженого світла, після чого додано по 50 мкл Stop Solution у кожну лунку. Визначено оптичну щільність (значення OD) кожної лунки одразу за допомогою імуноферментного аналізатора, встановленого на 450 нм.

2.7 Дослідження ліпідного спектру крові

Біохімічні методи досліджень виконані за допомогою реактивів фірми «Спайн Лаб» відповідно до інструкцій виробника на біохімічному аналізаторі Master T (Hospitex diagnostics) колориметричним методом:

- визначення кількості загального холестеролу в сироватці крові – набір ХОЛЕСТЕРИН СпЛ;
- визначення кількості холестеролу ліпопротеїдів низької щільності в сироватці крові – набір ХОЛЕСТЕРИН-ЛПНЩ СпЛ;
- визначення кількості холестеролу ліпопротеїдів високої щільності в сироватці крові – набір ХОЛЕСТЕРИН-ЛПВЩ СпЛ;
- визначення кількості триацилгліцеролу в сироватці крові – набір ТРИГЛІЦЕРИДИ СпЛ.

Протокол дослідження. Аналізатор налаштовано відповідно до вказівок у інструкції. Прилад встановлений на нуль відносно дистильованої води. Компоненти реакційної суміші відібрано та внесено у кювети в об'ємах, вказаних в інструкціях. Перемішано, інкубовано протягом 5 хв при 37 °С.

Виміряно оптичну щільність дослідного зразка і стандарту проти холостого зразка.

2.8 Статистична обробка

Дані представлені у вигляді $M \pm SEM$ (Standard Error of Measurement–Стандартна похибка вимірювання). Для статистичного аналізу між двома групами застосовували t-критерій Стьюдента, а між більшою кількістю груп проведений однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з попарним порівнянням груп за критерієм Бонфероні. Різницю вважали достовірною при $p < 0,05$. Обрахунки здійснено за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism версія 5.00 (GraphPad Software, Inc.).

РОЗДІЛ 3

КАРДІОПРОТЕКТИВНІ ЕФЕКТИ ПРЕПАРАТУ МЕТФОРМІН В Н9С2 КЛІТИНАХ ПРИ ГІПОКСІЇ ТА МЕТАБОЛІЧНОМУ СТРЕСІ

Для моделювання метаболічного стресу в експериментальних умовах використовується 2DG, яка є інгібітором обміну глюкози та конкурентно пригнічує її надходження у клітини, що призводить до порушення пентозно-фосфатного циклу та N-зв'язаного глікозування, результатом чого є розлади функцій протеїнів, ураження тілового обміну та, врешті, оксидативний стрес [158]. У дослідженнях, в яких використовували 2DG, доведено, що скоротливість кардіоміоцитів під її впливом значно зменшується навіть в умовах високої оксигенації, а також порушуються процеси гліколізу в клітинах міокарда, оскільки глюкоза не може бути використана повноцінно [159].

Зниження процесів гліколізу, який є адаптивним механізмом і дозволяє ефективніше використовувати енергію, є однією із основних особливостей діабетичного серця. Тому пацієнти із ЦД, у яких гліколітична активність міокарду зменшена у зв'язку із нездатністю засвоювати глюкозу, мають підвищену схильність до виникнення важких ускладнень та є більш чутливими до ішемічного або гіпоксичного ураження. Вважається, що при ішемії потреба серця в глюкозі та продуктах гліколізу різко зростає [159].

Гіпоксія, у свою чергу, є потенційним драйвером метаболічного репрограмування. Коли споживання кисню лімітоване, що обмежує окисне фосфорилування, серце починає споживати вуглеводи, метаболізм яких є більш економним, і вимагає менше кисню. Проте при ЦД цей механізм стає неможливим, тому діабетичне серце є надзвичайно чутливими до гіпоксії [160].

Хронічне метаболічне навантаження на серце призводить до поступового погіршення структури та функції міокарда. Це свідчить про те, що терапевтичні стратегії на ранніх стадіях захворювання повинні бути орієнтовані на

специфічні обмінні та структурні порушення, тому лікування пацієнтів із ЦД потрібно спрямовувати як на суворий контроль глікемічного профілю, так і на попередження серцево-судинних ускладнень [161].

3.1 Вивчення впливу метформіну на гіпертрофію H9C2 клітин при метаболічному та гіпоксичному стресі

У даній серії експериментів досліджено, чи має метформін прямий антигіпертрофічний вплив на кардіоміобласти, які піддаються метаболічному або гіпоксичному стресу. Висновок про антигіпертрофічний ефект метформіну робили на основі можливості препарату попереджувати збільшення площі клітин в присутності гіпертрофічних стимулів.

Результати морфометрії, наведені на рис.3.1, свідчать про те, що культивування H9C2 клітин у живильному середовищі, позбавленому сироватки (0 %), із додаванням 2DG у концентрації 2 ммоль/л протягом 24 год викликає значне, майже у 2 рази, збільшення площі кардіоміобластів: $(2494 \pm 47,43)$ мкм² у групі клітин, які піддавалися метаболічному стресу (2DG) проти $(1322 \pm 17,13)$ мкм² у групі контролю (C), $p < 0,001$.

Застосування метформіну у концентрації 5 ммоль/л не зумовлює вірогідних змін площі клітин, що не піддаються метаболічному стресу: $(1315 \pm 22,90)$ мкм² – площа кардіоміобластів без змодельованої гіпертрофії, що культивувалися у 0 % середовищі із метформіном (C + M), проти $(1322 \pm 17,13)$ мкм² у групі контролю (C).

Введення метформіну (5 ммоль/л) достовірно запобігає клітинній гіпертрофії, індукованій 2DG (2 ммоль/л): площі кардіоміобластів, що піддавалися метаболічному стресу у присутності метформіну (у 2DG + M групі) – $(1238 \pm 20,74)$ мкм² проти $(2494 \pm 47,43)$ мкм² у групі клітин, яким не проведено корекцію метаболічного стресу (2DG), $p < 0,001$.

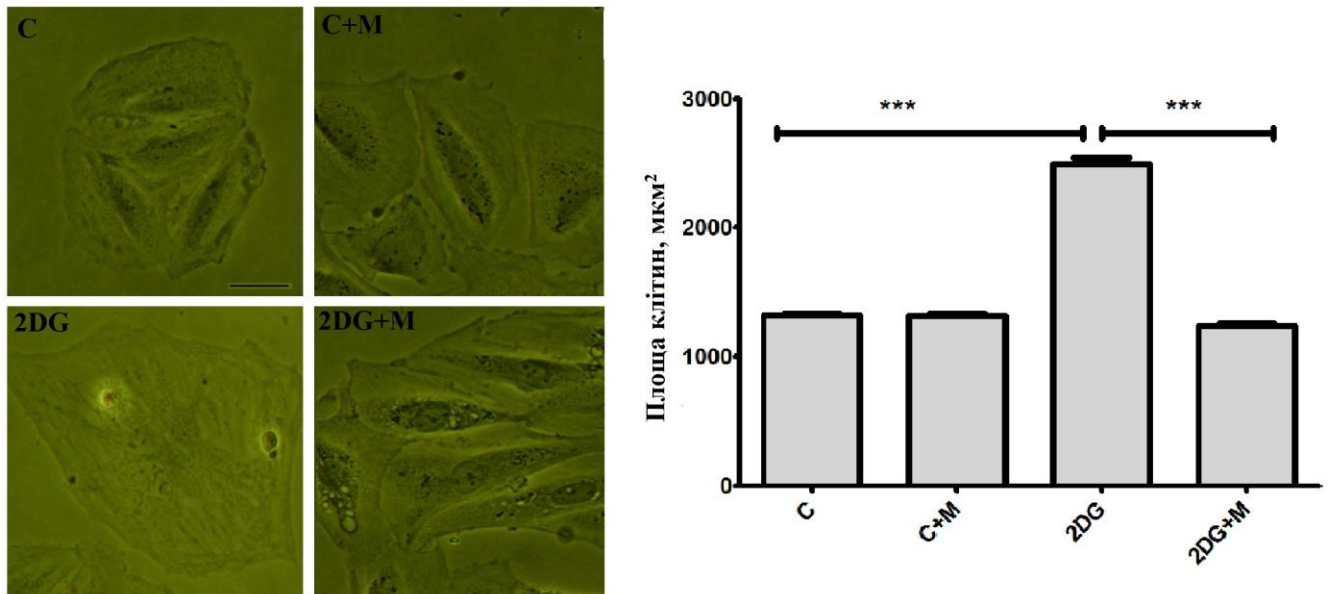


Рисунок 3.1 – Вплив метформіну на гіпертрофію Н9С2 клітин, зумовлену метаболічним стресом

Примітка. Зліва – репрезентативні зображення Н9С2 клітин в нормальних умовах (С) або за умов метаболічного стресу, викликаного 2-деокси-д-глюкозою упродовж 24 год, без або із лікуванням метформіном (М). Справа – результати морфометрії Н9С2 клітин відповідних груп. Масштаб шкали- 100 мкм. *** $p < 0,001$ між вказаними групами.

На рисунку 3.2 зображені структурні зміни Н9С2 клітин, які свідчать про те, що гіпоксичний стрес, індукований шляхом культивування депривованих у 0 % живильному середовищі кардіоміобластів у гіпоксичному боксі (1 % O_2) упродовж 24 год, провокує збільшення розмірів кардіоміобластів у 2,2 рази: площа Н9С2 клітин, інкубованих в умовах обмеженого доступу кисню (в Н групі) – $(2880 \pm 46,14)$ мкм² проти $(1321 \pm 17,14)$ мкм² у групі контролю (С), $p < 0,001$. Проте у присутності метформіну (5 ммоль/л) індукована гіпоксією гіпертрофія Н9С2 клітин попереджена: площа кардіоміобластів зі змодельованою гіпертрофією, яким введено метформін (у Н + М групі) – $(1459 \pm 13,42)$ мкм² проти $(2880 \pm 46,14)$ мкм² у Н групі, $p < 0,001$.

Застосування метформіну у концентрації 5 ммоль/л не викликає вірогідних морфологічних змін у структурі клітин, які не піддаються стресу: $(1312 \pm 22,74)$ мкм² – площа кардіоміобластів без змодельованої гіпертрофії, що

культивувалися у 0 % середовищі із метформіном (С + М), проти $(1322 \pm 17,13)$ мкм² у групі контролю (С).

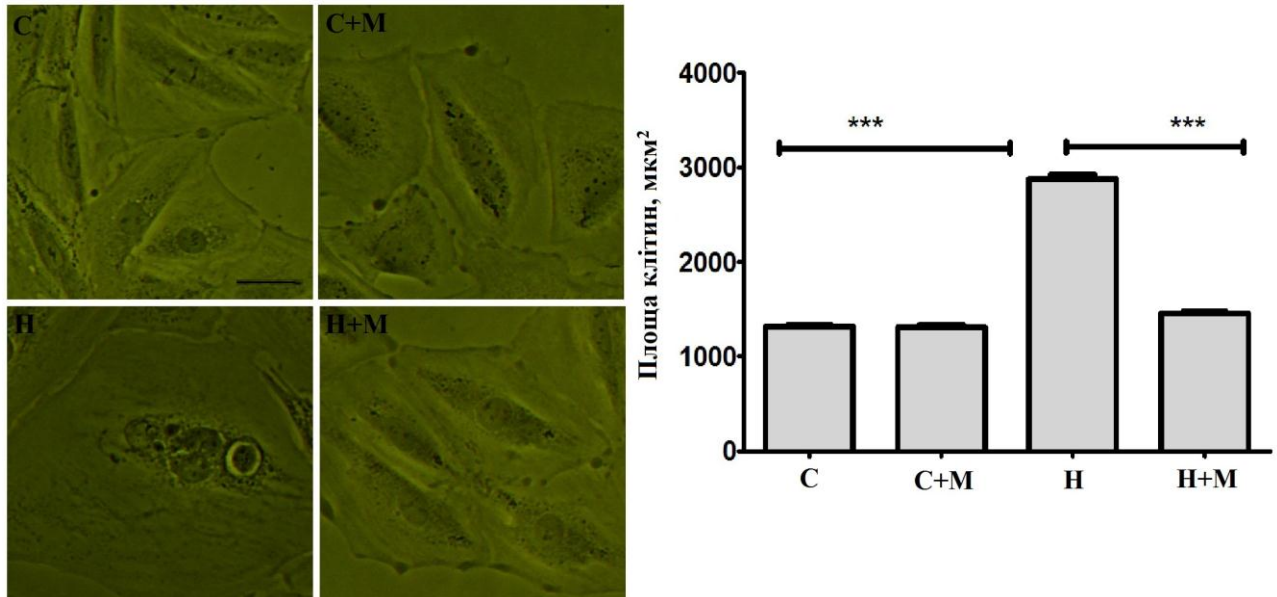


Рисунок 3.2 – Вплив метформіну на гіпертрофію Н9С2 клітин, індуковану гіпоксією

Примітка. Зліва – репрезентативні зображення Н9С2 клітин в умовах нормоксії (С) або гіпоксії (Н), викликані інкубацією кардіоміобластів у гіпоксичному боксі (1 % O₂) упродовж 24 год, без або із лікуванням метформіном (М). Справа – результати морфометрії Н9С2 клітин відповідних груп. Масштаб шкали 100 мкм. *** $p < 0,001$ між вказаними групами.

Отже, результати даного дослідження доводять, що препарат метформін володіє вираженими антигіпертрофічними властивостями в умовах як метаболічного, так і гіпоксичного стресу.

3.2 Вплив метформіну на процеси апоптозу Н9С2 клітин при метаболічному та гіпоксичному стресі

Апоптоз кардіоміоцитів, навіть при незначних його проявах, визнаний важливим компонентом у розвитку СН [162]. У наступній серії дослідів встановлено, чи впливає метформін на апоптичну відповідь Н9С2 клітин при метаболічному та гіпоксичному стресі.

Апоптичні клітини, які зафарбовані методом TUNEL та візуалізовані за допомогою імуофлюоресцентного мікроскопа, зображені на рисунку 3.3 та ідентифіковані завдяки флуоресцентному світінню яскраво-зеленого кольору.

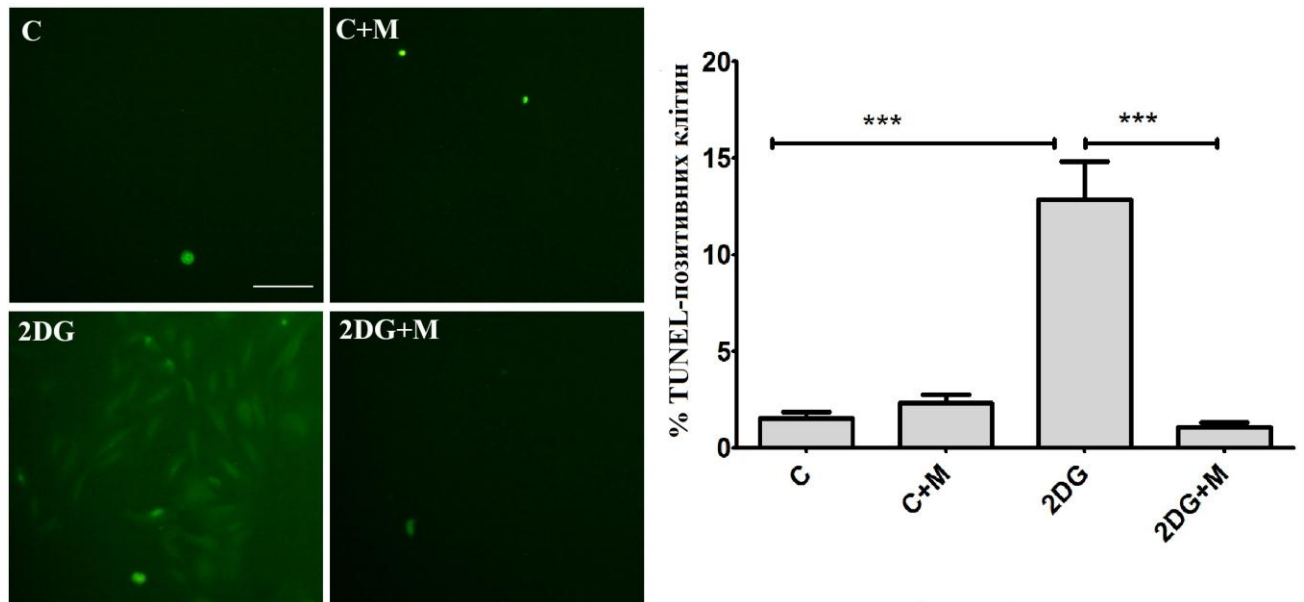


Рисунок 3.3 – Вплив метформіну на апоптоз Н9С2 клітин, спровокований метаболічним стресом

Примітка. Зліва – репрезентативні зображення зафарбованих методом TUNEL апоптичних Н9С2 клітин в нормальних умовах (С) або за умов метаболічного стресу, викликаного 2-деокси-d-глюкозою упродовж 24 год, без або із лікуванням метформіном (М). Справа – результати підрахунку відсотка апоптичних Н9С2 клітин відповідних груп. Масштаб шкали 100 мкм. *** $p < 0,001$ між вказаними групами.

Введення метформіну у концентрації 5 ммоль/л у живильне середовище кардіоміобластів, що інкубуються за нормальних умов, не викликає достовірного впливу на процеси програмованої загибелі: частка апоптичних клітин становить ($2,32 \pm 0,44$) % у С + М групі (у медіум, в якому інкубувалися клітини, що не піддавалися стресу, додавали метформін) проти ($1,54 \pm 0,31$) % у С групі (контроль).

Культивування Н9С2 клітин у присутності 2DG протягом 24 год спричиняє збільшення відносної кількості клітин, загиблих шляхом апоптозу, у 8 разів: ($12,88 \pm 1,96$) % у 2DG групі (індукований метаболічний стрес) проти ($1,54 \pm 0,31$) % у С групі (контроль), $p < 0,001$. Проте застосування

метформіну достовірно запобігає клітинному апоптозу в умовах метаболічного стресу, як порівняти з нелікованими Н9С2 клітинами: $(1,09 \pm 0,24) \%$ у 2DG + М групі (індукований метаболічний стрес та введення метформіну) проти $(12,88 \pm 1,97) \%$ у 2 DG групі (індукований метаболічний стрес), $p < 0,001$.

Результати впливу метформіну, застосованого за 30 хв до стресу у концентрації 5 ммоль/л, на процеси програмованої загибелі Н9С2 клітин, зумовленої гіпоксією, наведено на рис.3.4.

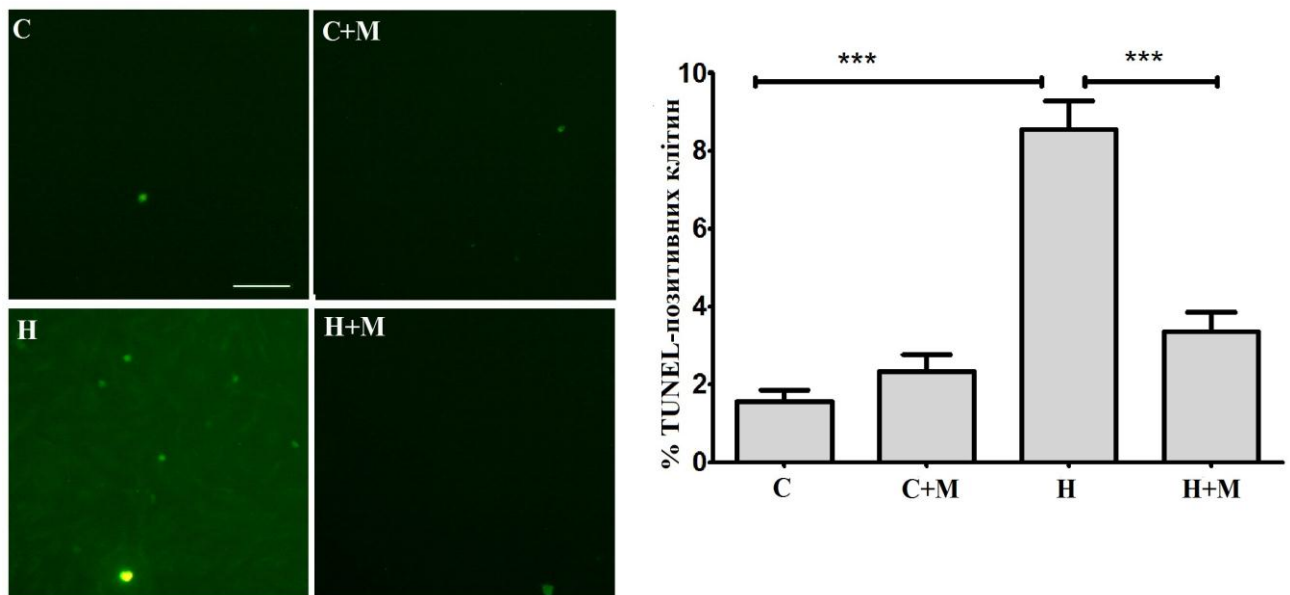


Рисунок 3.4 – Вплив метформіну на запрограмовану загибель Н9С2 клітин, зумовлену гіпоксичним стресом

Примітка. Зліва – репрезентативні зображення зафарбованих методом TUNEL апоптичних Н9С2 клітин в умовах нормоксії (С) або гіпоксії (Н), викликаній інкубацією кардіоміобластів у гіпоксичному боксі (1 % O₂) упродовж 24 год, без або із лікуванням метформіном (М). Справа – результати підрахунку відсотка апоптичних Н9С2 клітин відповідних груп. Масштаб шкали 100 мкм.*** $p < 0,001$ між вказаними групами.

Застосування метформіну не викликає вірогідного збільшення відносної кількості загиблих шляхом апоптозу Н9С2 клітин, які не піддавалися стресу: $(2,32 \pm 0,44) \%$ – частка апоптичних клітин у групі С + М (інкубація в умовах нормоксії та введення метформіну) проти $(1,54 \pm 0,31) \%$ у С групі (контроль).

За умов гіпоксії достовірно збільшення (у 5,5 разів) відносної кількості кардіоміобластів, загиблих шляхом апоптозу, спостерігається через 24 год: їх частка у Н групі (індукована гіпоксія) становить $(8,54 \pm 0,73) \%$ проти $(1,54 \pm 0,31) \%$ у С групі (нормоксія), $p < 0,001$. Проте у присутності метформіну індукований гіпоксією апоптоз Н9С2 клітин попереджено: $(3,35 \pm 0,50) \%$ у Н + М групі (індукована гіпоксія та лікування метформіном) проти $(8,54 \pm 0,73) \%$ у Н групі (гіпоксія), $p < 0,001$.

Таким чином, ці дані демонструють здатність метформіну запобігати гіпертрофії Н9С2 клітин, яку провокує метаболічний та гіпоксичний стрес.

Отже, результати даного дослідження доводять, що препарат метформін володіє вираженими антиапоптичними властивостями в умовах і метаболічного, і гіпоксичного стресу.

3.3 Вивчення механізму антигіпертрофічної дії препарату метформін в Н9С2 клітинах

Проаналізувавши наукові публікації, де доведено, що ген FoxO1 відіграє важливу роль у підтримці кардіального гомеостазу [153], ми вирішили перевірити гіпотезу, чи бере участь його експресія у механізмі дії метформіну в Н9С2 клітинах, зокрема, у попередженні гіпертрофії та апоптозу. Для цього ми досліджували ефекти препарату при нормальній та заблокованій експресії гена FoxO1.

За допомогою ЗТ-ПЛР в реальному часі підтверджено, що експресія гена FoxO1 після трансфекції Н9С2 клітин із siРНК FoxO1 достовірно зменшується у 2,6 рази (рис. 3.5).

Незначну експресію гена FoxO1 у групах трансфетованих із siРНК FoxO1 клітин можна пояснити тим, що до етапу трансфекції клітини були у конфлюентності 40-60 % і експресували ген FoxO1.

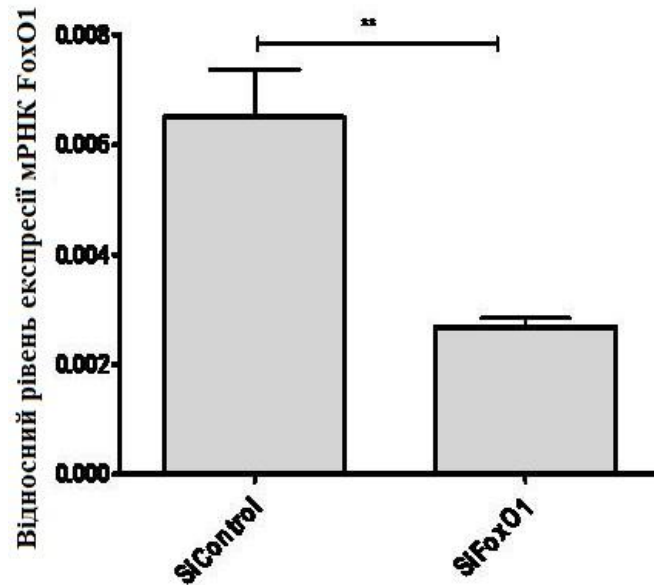


Рисунок 3.5 – Зміни експресії гена FoxO1 в H9C2 клітинах після трансфекції гена за допомогою siРНК FoxO1

Примітка. H9C2 клітини трансфектовані за допомогою контрольної siРНК (siControl) або siРНК проти FoxO1 (siFoxO1). Рівень експресії FoxO1 гена визначений за допомогою ЗТ-ПЛР в реальному часі. ** $p < 0,01$ між вказаними групами.

На рис. 3.6 продемонстровано, що культивування кардіоміоцитів ембріонів щурів в умовах гіпоксії-реоксигенації достовірно викликає збільшення їх площі як у випадку фізіологічної експресії гена FoxO1, так і при його блокуванні за допомогою siРНК FoxO1: $(4333 \pm 123,70)$ мкм² – площа клітин у групі Н + siРНК Control (індукована гіпоксія-реоксигенація при нормальній функції гена) проти $(1504 \pm 20,90)$ мкм² у групі С + siРНК Control (контроль), $p < 0,001$, та $(6969 \pm 167,50)$ мкм² – площа клітин у групі Н + siРНК FoxO1 (індукована гіпоксія-реоксигенація при пригніченій експресії гена) проти $(1504 \pm 20,90)$ мкм² у групі С + siРНК Control, $p < 0,001$.

Введення метформіну достовірно захищає H9C2 клітини від індукованої гіпоксією-реоксигенацією гіпертрофії при нормальному функціонуванні гена FoxO1: $(1397 \pm 19,58)$ мкм² – площа клітин у групі Н + М + siРНК Control (індукована гіпоксія-реоксигенація та корекція метформіном при нормальній функції гена) проти $(4333 \pm 123,70)$ мкм² у групі Н + siРНК Control, $p < 0,001$.

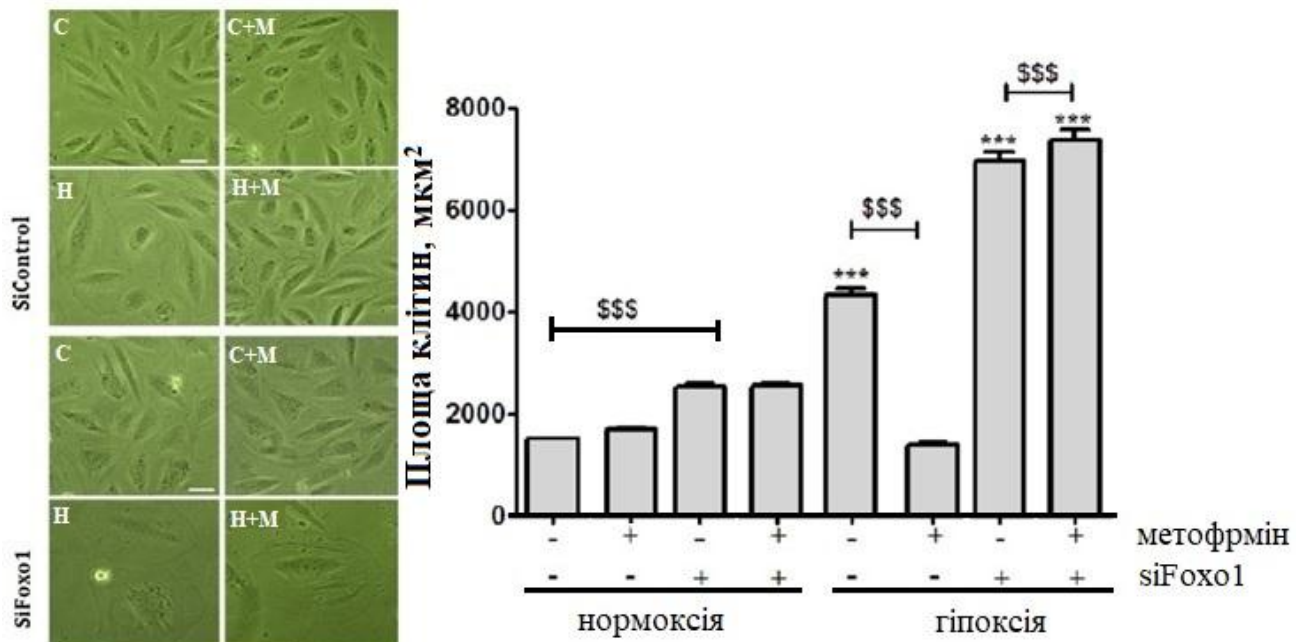


Рисунок 3.6 – Вплив метформіну на площу Н9С2 клітин при індукованому гіпоксією-реоксигенацією стресі при фізіологічній чи блокованій експресії гена FoxO1

Примітка. Зліва – репрезентативні зображення Н9С2 клітин, трансфектованих за допомогою контрольної siРНК (siControl) або siРНК FoxO1 (siFoxO1) в умовах нормоксії (С) або гіпоксії-реоксигенації (Н), викликаної інкубацією кардіоміобластів у гіпоксичному боксі (1% O₂) упродовж 16 год із наступною реоксигенацією упродовж 4 год, без або із лікуванням метформіном (М). Справа – результати морфометрії Н9С2 клітин відповідних груп. Масштаб шкали – 100 мкм. *** $p < 0,001$, \$\$\$ $p < 0,001$ між вказаними групами.

Проте у випадку блокування гена FoxO1 препарат метформін втрачає свою властивість попереджати гіпертрофію кардіоміобластів в умовах гіпоксії: $(7383 \pm 193,0)$ мкм² – площа клітин у групі Н + М + siРНК FoxO1 (індукована гіпоксія-реоксигенація та корекція метформіном при пригніченій експресії гена) проти $(1397 \pm 19,58)$ мкм² у групі Н + М + siРНК Control та проти $(1504 \pm 20,90)$ мкм² у групі С + siРНК Control, $p < 0,001$.

Враховуючи вищенаведені результати, можна було б припустити, що FoxO1 шлях є потенційним механізмом, через який метформін реалізував свій антигіпертрофічний ефект у Н9С2 клітинах, оскільки виключення експресії гена FoxO1 призводить до втрати препаратом здатності попереджати збільшення площі кардіоміоцитів під впливом гіпоксії.

Проте, блокування гена FoxO1 призводить до гіпертрофії H9C2 клітин і в усіх інших умовах, навіть при нормоксії: $(2543 \pm 48,82)$ мкм² – площа клітин у групі C + siРНК FoxO1 (інкубація в умовах нормоксії при пригніченій експресії гена) та $(2552 \pm 40,50)$ мкм² – площа клітин у групі C + M + siРНК FoxO1 (інкубація в умовах нормоксії та корекція метформіном при пригніченій експресії гена) проти $(1504 \pm 20,90)$ мкм² – площа клітин у групі C + siРНК Control, $p < 0,001$. У той же час, площі клітин у групах C + M + siРНК Control (інкубація за умов нормоксії та корекція метформіном при нормальній функції гена) та C + siРНК Control достовірно не відрізнялася: $(1694 \pm 22,78)$ мкм² та $(1504 \pm 20,90)$ мкм² відповідно.

Це свідчить про те, що саме виключення експресії гена FoxO1 провокує гіпертрофічну відповідь клітин, тобто, нормальне функціонування гена є обов'язковою умовою для підтримки фізіологічних розмірів кардіоміоцитів.

На рисунку 3.7 зображено, що культивування кардіоміоцитів ембріонів щурів в умовах гіпоксії-реоксигенації (H) достовірно провокує їх апоптоз як у випадку фізіологічної експресії гена FoxO1, так і при його блокуванні за допомогою siРНК FoxO1: частка апоптичних клітин становить $(16,56 \pm 2,94)$ % у групі H + siРНК Control проти $(5,10 \pm 1,23)$ % у групі C + siРНК Control, $p < 0,001$, та $(21,50 \pm 3,92)$ % у групі H + siРНК FoxO1 проти $(5,10 \pm 1,23)$ % у групі C + siРНК Control, $p < 0,001$.

Введення метформіну достовірно захищає кардіоміобласти від індукованої гіпоксією-реоксигенацією програмованої загибелі при нормальному функціонуванні гена FoxO1, що підтверджує антиапоптичний ефект препарату: відносна кількість апоптичних клітин – $(4,95 \pm 1,19)$ % у групі H + M + siРНК Control проти $(16,56 \pm 2,94)$ % у групі H + siРНК Control, $p < 0,001$.

Додавання метформіну у живильне середовище кардіоміобластів, що не піддавалися стресу внаслідок гіпоксії-реоксигенації, не спричиняє посилення програмованої загибелі H9C2 клітин: частка загиблих шляхом апоптозу клітин

складає ($4,66 \pm 0,86$) % у групі C + M + siРНК Control та ($7,12 \pm 1,92$) % у групі C + M + siРНК FoxO1 проти ($5,10 \pm 1,23$) % у групі C + siРНК Control.

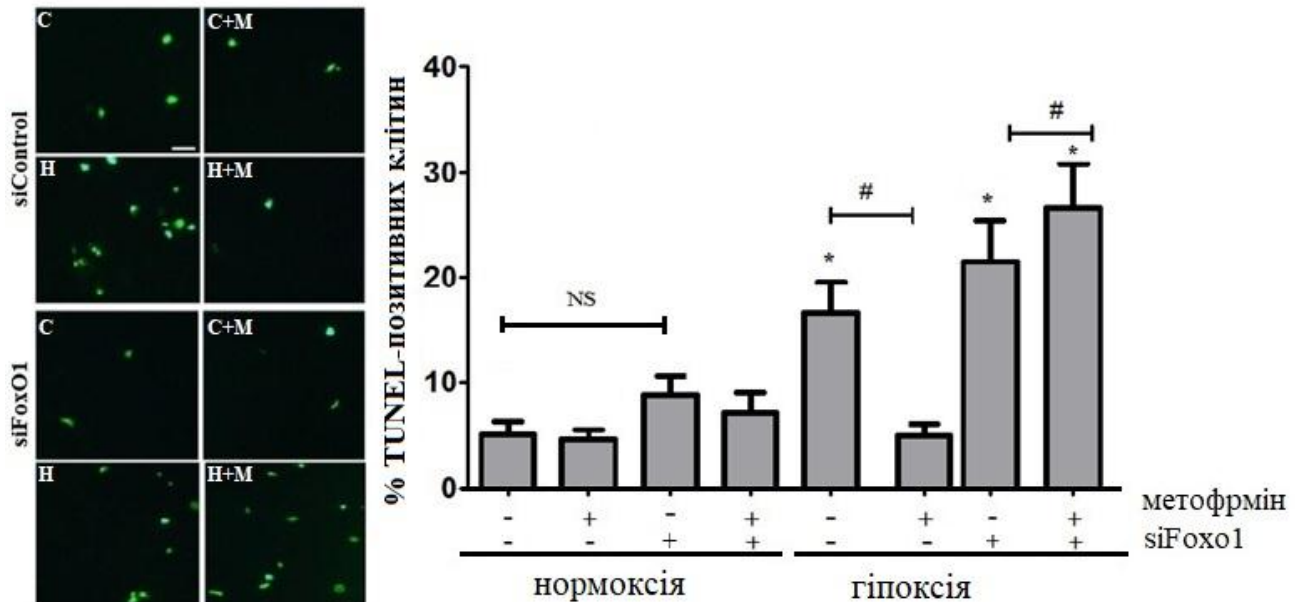


Рисунок 3.7 – Вплив метформіну на апоптоз Н9С2 клітин при індукованому гіпоксією-реоксигенацією стресі при фізіологічній чи блокованій експресії гена FoxO1

Примітка. Зліва – репрезентативні зображення зафарбованих методом TUNEL апоптичних Н9С2 клітин, трансфектованих за допомогою контрольної siРНК (siControl) або siРНК FoxO1 (siFoxO1) в умовах нормоксії (С) або гіпоксії-реоксигенації (Н), викликаній інкубацією кардіоміобластів у гіпоксичному боксі (1 % O₂) упродовж 16 год із наступною реоксигенацією упродовж 4 год, без або із лікуванням метформіном (М). Справа – результати підрахунку відсотка апоптичних Н9С2 клітин відповідних груп. Масштаб шкали – 25 мкм. * $p < 0,05$, # $p < 0,05$, NS – різниця недостовірна між вказаними групами.

Проте, при трансфекції Н9С2 клітин за допомогою siРНК FoxO1 метформін втрачає свою властивість запобігати програмою загибелі кардіоміобластів в умовах гіпоксії-реоксигенації: частка клітин, загиблих шляхом апоптозу, становить ($26,55 \pm 4,23$) % у групі Н + М + siРНК FoxO1 проти ($4,95 \pm 1,19$) % у групі Н + М + siРНК Control та проти ($5,10 \pm 1,23$) % у групі С + siРНК Control, $p < 0,001$. Тобто, при блокуванні експресії FoxO1 гена препарат втрачає свої протективні властивості.

Наведені результати дозволяють дійти висновку, що FoxO1 шлях є потенційним механізмом, через який метформін реалізує свій антиапоптичний ефект у H9C2 клітинах, оскільки виключення експресії гена FoxO1 призводить до втрати препаратом здатності попереджати апоптоз кардіоміоцитів під впливом гіпоксії-реоксигенації.

Крім того, трансфекція гена FoxO1 не викликає збільшення відносної кількості апоптичних клітин при нормоксії: частка клітин у групі C + siРНК FoxO1 становить $(8,85 \pm 1,71) \%$ проти $(5,10 \pm 1,23) \%$ у групі C + siРНК Control.

Це свідчить про те, що підвищена загибель клітин у групі H + M + siРНК FoxO1 пов'язана лише із FoxO1-залежним механізмом антиапоптичної дії метформіну, а не з безпосереднім впливом експресії гена на запрограмовану загибель кардіоміоцитів.

Отже, втрата здатності метформіном захищати кардіоміоцити від апоптозу, індукованого гіпоксією-реоксигенацією, при блокуванні FoxO1 гена, у той час, як в інших умовах трансфекція не призводить до жодних змін, свідчить про те, що винайдено новий, досі не описаний, FoxO1-залежний механізм антиапоптичної дії препарату метформін в H9C2 клітини в умовах гіпоксії-реоксигенації.

Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлено, що:

- метформін проявляє виражену кардіопротективну дію на H9C2 клітини, оскільки лікування цим препаратом достовірно запобігає гіпертрофії кардіоміобластів та зменшує їх запрограмовану загибель як в умовах метаболічного, так і гіпоксичного стресу;
- описано FoxO1-залежний механізм антиапоптичної дії препарату метформін в H9C2 клітинах в умовах гіпоксії-реоксигенації;
- з'ясовано, що інгібування експресії гена FoxO1 призводить до гіпертрофії кардіоміобластів, тому його нормальна функція є критично необхідною умовою для підтримки фізіологічних розмірів клітин.

Результати, викладені у розділі 3, опубліковано у 2 статтях [163, 164] та доповідалися на конференціях [165, 166, 167, 168, 169]. За результатами розділу отримано патент на винахід [170].

РОЗДІЛ 4

КАРДІОПРОТЕКТИВНІ ЕФЕКТИ ПРЕПАРАТУ МЕТФОРМІН ПРИ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ У МИШЕЙ

Епідеміологічні та клінічні дані демонструють, що діабетичне серце є вкрай чутливим до ураження внаслідок ішемії-реперфузії [9]. Ішемія-реперфузія виникає тоді, коли обструкція вінцевих судин супроводжується відновленням кровотоку до ішемізованого міокарда [171]. Хоча вчасно проведена реперфузія вважається оптимальною терапевтичною стратегією, ця процедура може призвести до летального ураження серцевих тканин [172]. Це обумовлено тим, що реперфузія сприяє вивільненню великої кількості похідних кисню вільних радикалів, чим викликає реперфузійне ураження. У численних дослідженнях спостерігали погіршення кардіальної функції та, більше того, посилення пошкодження міокарда в результаті реперфузії [171,173,174].

Враховуючи результати *in vitro*, які засвідчили виражені кардіопротективні ефекти препарату метформін на стресові клітинні реакції, ми дослідили активність даного лікарського засобу *in vivo* на процеси ремоделювання міокарду у мишей після пошкодження внаслідок ішемії-реперфузії. Щоб оцінити трансляційний потенціал метформіну, лікування було розпочато через 15 хв після ішемії-реперфузії у дозі 5 мг/кг інтраперитонеально та тривало 14 днів.

4.1 Вплив метформіну на гіпертрофію кардіоміоцитів після ішемії-реперфузії міокарда у мишей

Щоб дослідити вплив метформіну на гіпертрофічну відповідь кардіоміоцитів, зразки тканин міокарду були зафарбовані за допомогою гематоксиліну та еозину або WGA. Окрім того, було досліджено експресію генів, відповідальних за процеси гіпертрофії.

Гістологічне дослідження зрізів міокарда, забарвлених за допомогою гематоксиліну та еозину (рис.4.1) продемонструвало, що ішемія-реперфузія викликає гіпертрофію кардіоміоцитів: площа клітин – $(521,90 \pm 5,28)$ мкм² у контрольній (С) групі проти $(782,10 \pm 10,41)$ мкм² у групі тварин із ішемією-реперфузією (I/R), $p < 0,001$.

Введення метформіну (М) у мишей, яким ішемію-реперфузію не проводили, вірогідно не змінює площу кардіоміоцитів: $(495,40 \pm 6,64)$ мкм² у (С+М) групі проти $(521,90 \pm 5,28)$ мкм² у (С) групі.

Лікування метформіном після ішемії-реперфузії призводить до достовірного зменшення розмірів кардіоміоцитів: середня площа клітин у групі тварин із ішемією-реперфузією, пролікованих метформіном (I/R + М), – $(523,50 \pm 4,64)$ мкм² проти нелікованих (I/R) – $(782,10 \pm 10,41)$ мкм², $p < 0,001$.

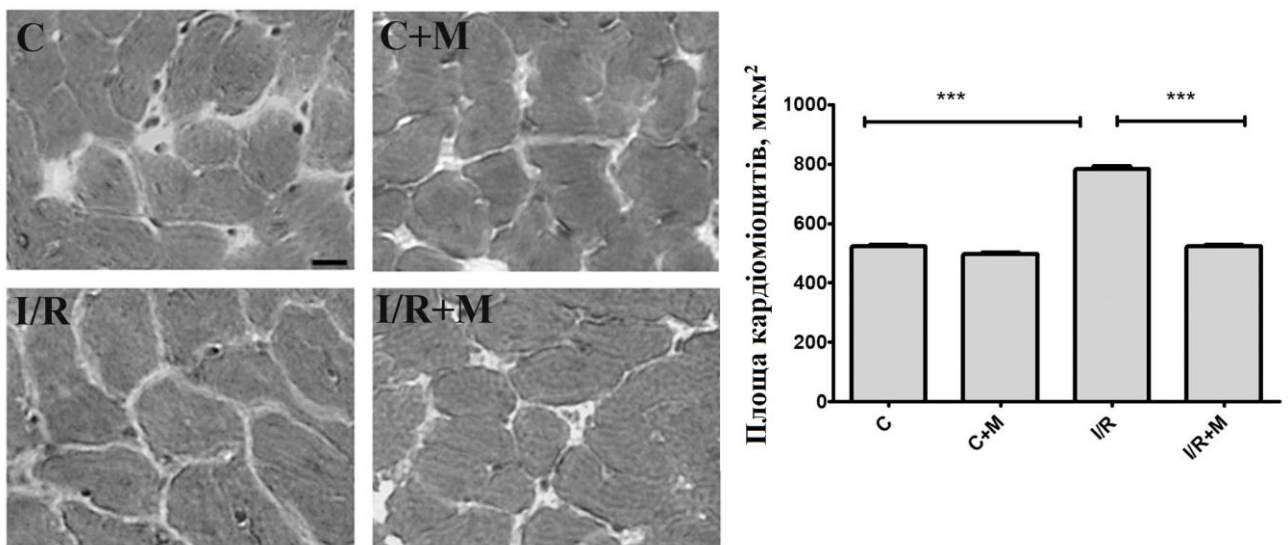


Рисунок 4.1 – Вплив метформіну на гіпертрофію кардіоміоцитів, спровоковану ішемією-реперфузією (зabarвлення гематоксиліном та еозином)

Примітка. Зліва – репрезентативні зображення заморожених зрізів міокарда мишей, яким проведено ішемію-реперфузію (I/R), або контрольної групи (С), без або із лікуванням метформіном (М) у дозі 5 мг/кг, зафарбованих за допомогою гематоксиліну та еозину. Справа – результати морфометрії кардіоміоцитів. Масштаб шкали 10 мкм. *** $p < 0,001$ між вказаними групами.

Гістологічне дослідження міокарда, забарвленого за допомогою WGA (рис. 4.2) підтвердило попередні результати. Встановлено, що ішемія-реперфузія провокує гіпертрофічну відповідь у кардіоміоцитах: середня площа клітин ($493,10 \pm 7,43$) мкм^2 у контрольній (C) групі проти ($981,40 \pm 21,64$) мкм^2 у групі тварин із ішемією-реперфузією (I/R), $p < 0,001$.

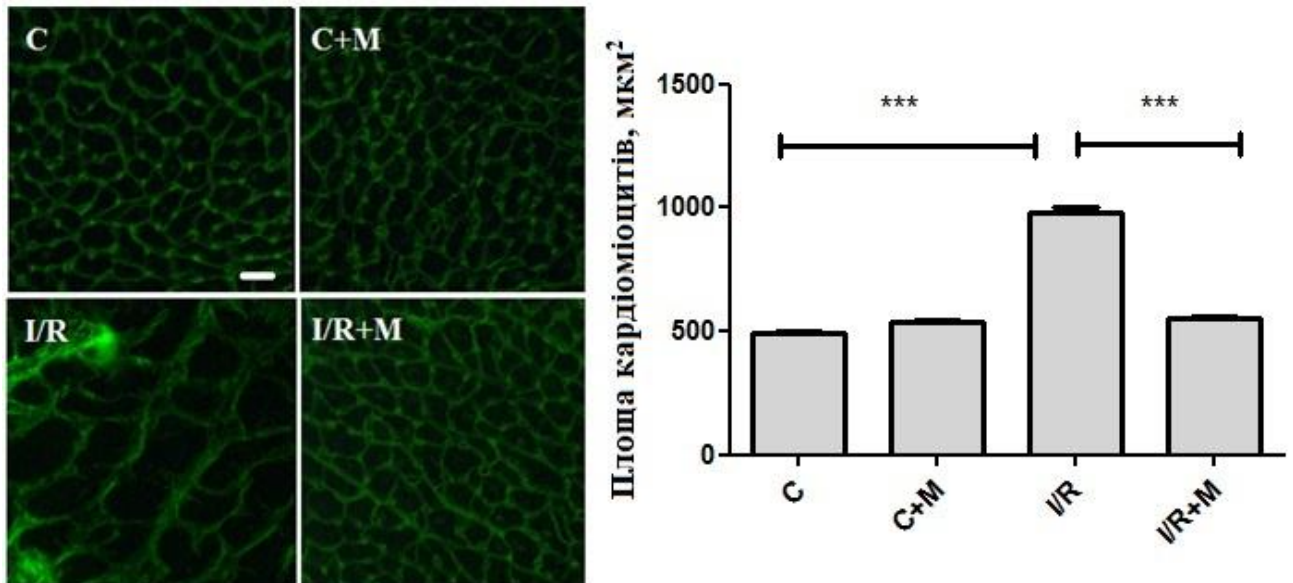


Рисунок 4.2 – Вплив метформіну на гіпертрофію кардіоміоцитів, спровоковану ішемією-реперфузією (забарвлення WGA)

Примітка. Зліва – репрезентативні зображення заморожених зрізів міокарда мишей, яким проведено ішемію-реперфузію (I/R), або контрольної групи (C), без або із лікуванням метформіном (M) у дозі 5 мг/кг, зафарбованих за допомогою WGA. Справа – результати морфометрії кардіоміоцитів. Масштаб шкали 25 $\mu\text{м}$. *** $p < 0,001$ між вказаними групами.

Застосування метформіну у мишей, яким ішемію-реперфузію міокарда не проведено, не викликає структурних змін міокарда: площа кардіоміоцитів у групі (C+M) становить ($534,30 \pm 7,59$) мкм^2 проти ($493,10 \pm 7,43$) мкм^2 у (C) групі.

Лікування метформіном після ішемії-реперфузії призвело до достовірного зменшення розмірів кардіоміоцитів: середня площа клітин у групі тварин із ішемією-реперфузією, пролікованих метформіном (I/R + M), – ($549,0 \pm 7,89$) мкм^2 проти нелікованих (I/R) – ($981,40 \pm 21,64$) мкм^2 , $p < 0,001$.

При ураженні міокарда відбувається активація фетальних генів, відповідальних за ремоделювання міокарда, зокрема, BNP та важкого ланцюга міозину β (β -МНС) [175].

Для того, щоб підтвердити результати гістологічного аналізу, що свідчать про антигіпертрофічний ефект метформіну, ми провели дослідження експресії генів, відповідальних за процеси росту клітин.

Визначивши рівень мРНК BNP у зразках міокарда (рис. 4.3), який є маркером шлуночкової гіпертрофії [175], встановлено, що ішемія-реперфузія (I/R) провокує підвищення функції гена у 2,86 рази, $p < 0,01$.

Лікування мишей метформіном достовірно запобігає індукованій ішемією-реперфузією ап-регуляції BNP гена, зменшуючи рівень його експресії у 2,1 рази (I/R+M), як порівняти із нелікованими тваринами, $p < 0,05$.

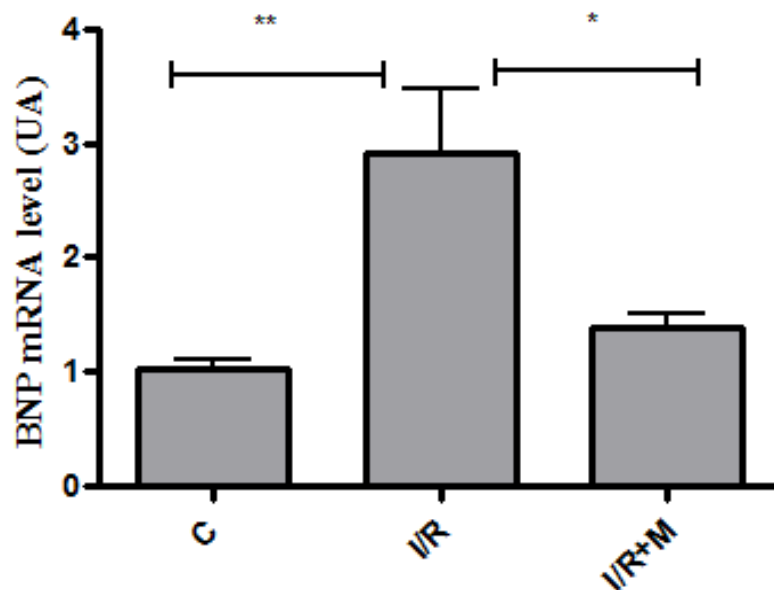


Рисунок 4.3 – Вплив метформіну на експресію гена BNP після ішемії-реперфузії

Примітка. Аналіз рівнів експресії гена BNP за допомогою ПЛР в реальному часі в міокарді мишей, яким проведено ішемію-реперфузію (I/R), або контрольної групи (C), при лікуванні метформіном (M) у дозі 5 мг/кг. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ між вказаними групами.

У процес скорочення серцевого м'яза залучені важкі ланцюги міозину (α -МНС і β -МНС), співвідношення яких є критичним фактором для скоротливої

функції міокарда [176]. У нормі α -МНС є доміантною ізоформою, проте при кардіальній дисфункції виникає ап-регуляція β -МНС гена [175]. Активація транскрипції β -МНС є ранньою чутливою ознакою гіпертрофії кардіоміоцитів [177].

Дослідження впливу метформіну на експресію генів α -МНС і β -МНС після ішемії-реперфузії у мишей зображено на рис. 4.4.

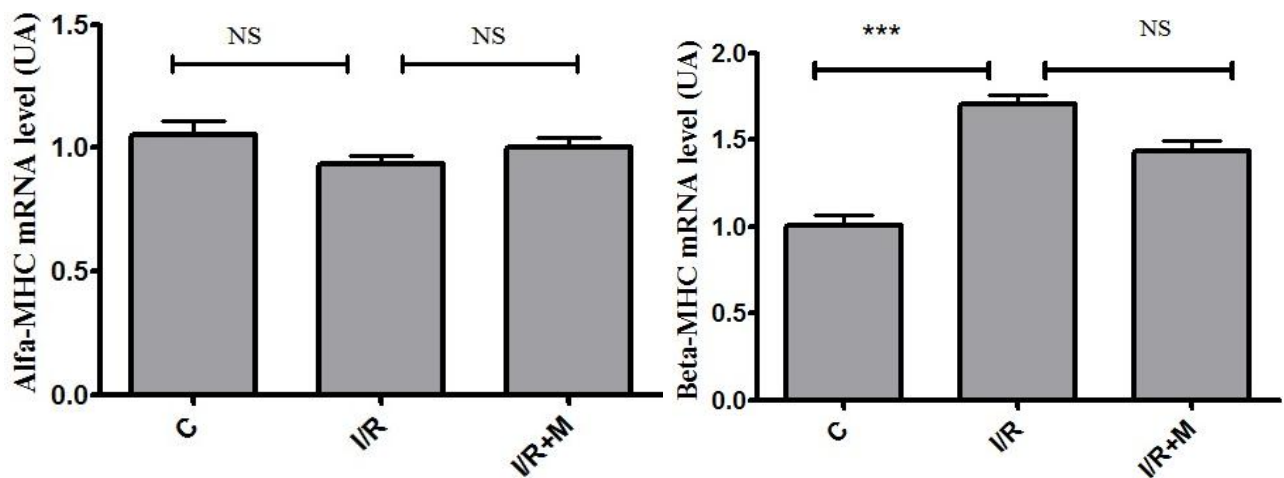


Рисунок 4.4 – Вплив метформіну на експресію генів α -МНС та β -МНС після ішемії-реперфузії

Примітка. Аналіз рівнів експресії генів α -МНС та β -МНС за допомогою ПЛР в реальному часі в міокарді мишей, яким проведено ішемію-реперфузію (I/R), або контрольної групи (C), при лікуванні метформіном (M) у дозі 5 мг/кг. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ між вказаними групами.

За допомогою ПЛР в реальному часі встановлено, що ішемія-реперфузія (I/R) провокує підвищення експресії β -МНС у 1,69 рази, $p < 0,001$, хоча експресія α -МНС не зазнає достовірних змін, зменшуючись на 11 %, порівнюючи із контролем.

При застосуванні метформіну (I/R+M) рівень мРНК α -МНС збільшується на 6,9 %, а β -МНС – зменшується на 15,8 %, як порівняти із нелікованими мишами після ішемії-реперфузії, проте зміни ці зміни не є статистично достовірними:

Отже, в даному дослідженні підтверджено, що метформін володіє вираженим антигіпертрофічним ефектом на кардіоміоцити при моделюванні ішемії-реперфузії у мишей. Крім того, лікування метформіном інгібує індуковану ішемією-реперфузією ап-регуляцію BNP. У той же час встановлено, що препарат не впливає на експресію генів α - та β -MHC.

4.2 Вплив метформіну на апоптоз кардіоміоцитів після ішемії-реперфузії міокарда у мишей

Клітини серця, які піддаються патологічним впливам, мають порушений баланс у процесах виживання та смертності [178], тому в кінцевому результаті вони гинуть внаслідок апоптозу [77]. Активація апоптичного механізму призводить до прогресування СН [178].

Дослідження гістологічних зрізів міокарда, забарвлених за допомогою методу TUNEL (рис. 4.5), який надає апоптичним клітинам яскраво-зелене флюоресцентне забарвлення, свідчить про здатність метформіну запобігати програмованій загибелі.

Встановлено, що ішемія-реперфузія провокує достовірне збільшення відносної кількості апоптичних клітин: $(1,90 \pm 0,65) \%$ у контрольній (С) групі проти $(15,19 \pm 1,96) \%$ у групі тварин після змодельованої ішемії-реперфузії (I/R), $p < 0,001$.

Введення метформіну мишам, яким операцію не проведено (С+М), не чинить достовірного впливу на процеси програмованої загибелі кардіоміоцитів: частка загиблих шляхом апоптозу клітин міокарда становить $(1,66 \pm 0,34) \%$ проти $(1,90 \pm 0,65) \%$ у контрольній (С) групі.

Лікування метформіном після ішемії-реперфузії призводить до достовірного зменшення кількості апоптичних клітин: $(1,09 \pm 0,14) \%$ у групі тварин із ішемією-реперфузією, пролікованих метформіном (I/R + М), проти $(15,19 \pm 1,96) \%$ у групі нелікованих тварин (I/R), $p < 0,001$.

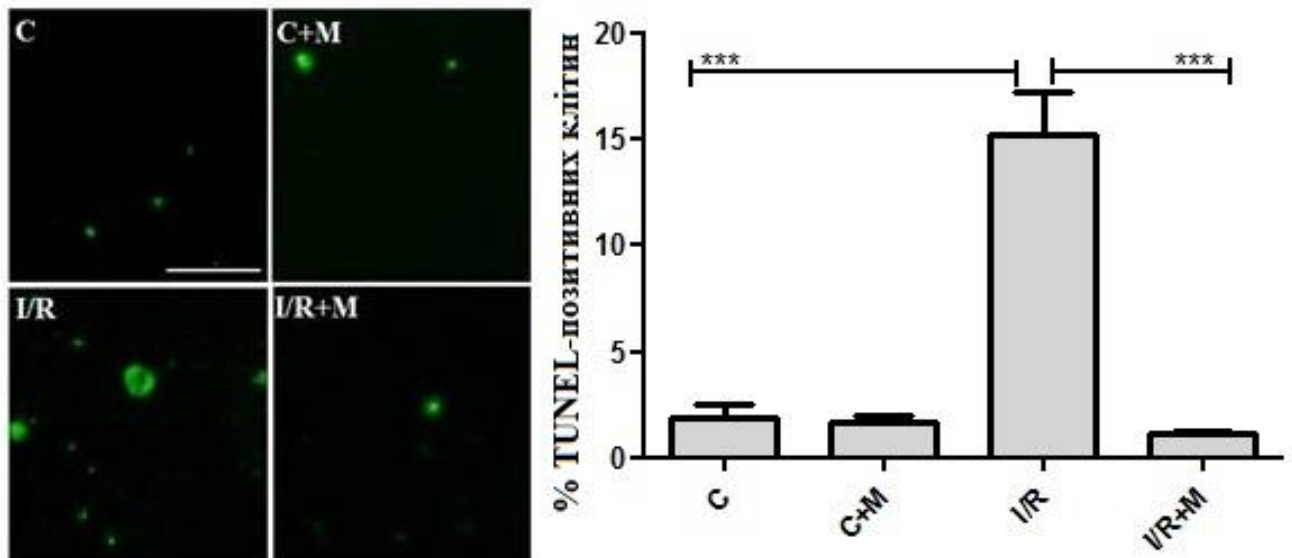


Рисунок 4.5 – Вплив метформіну на апоптоз кардіоміоцитів, спровокований ішемією-реперфузією

Примітка. Зліва – репрезентативні зображення зафарбованих методом TUNEL заморожених зрізів міокарда мишей, яким проведено ішемію-реперфузію (I/R), або контрольної групи (C), без або із лікуванням метформіном (M) у дозі 5 мг/кг. Справа – результати підрахунку відсотка апоптичних клітин відповідних груп. Масштаб шкали 100 мкм. *** $p < 0,001$ між вказаними групами.

За допомогою ПЛР у реальному часі досліджено експресію генів у міокарді, які залучені у процеси апоптозу (рис. 4.6). З'ясовано, що ішемія-реперфузія (I/R) провокує ап-регуляцію проапоптичних генів, зокрема, каспазу 3 та Вах, збільшуючи рівні їх мРНК на 88,5 %, $p < 0,05$, та 30 %, $p < 0,05$, відповідно. Водночас виникає даун-регуляція антиапоптичного гена Bcl2, рівень його мРНК зменшується на 20 %, $p < 0,05$.

При лікуванні метформіном спостерігається тенденція до зниження експресії гена каспаза 3, рівень його мРНК зменшується на 28,5 % у групі (I/R+M), порівнюючи із нелікованими після ішемії-реперфузії мишами (I/R), проте різниця не є вірогідною.

Препарат не запобігає індукованій ішемією-реперфузією ап-регуляції гена Вах: рівень його мРНК знижується на 14,5 % (I/R+M), як порівняти з групою (I/R), проте різниця недостовірна.

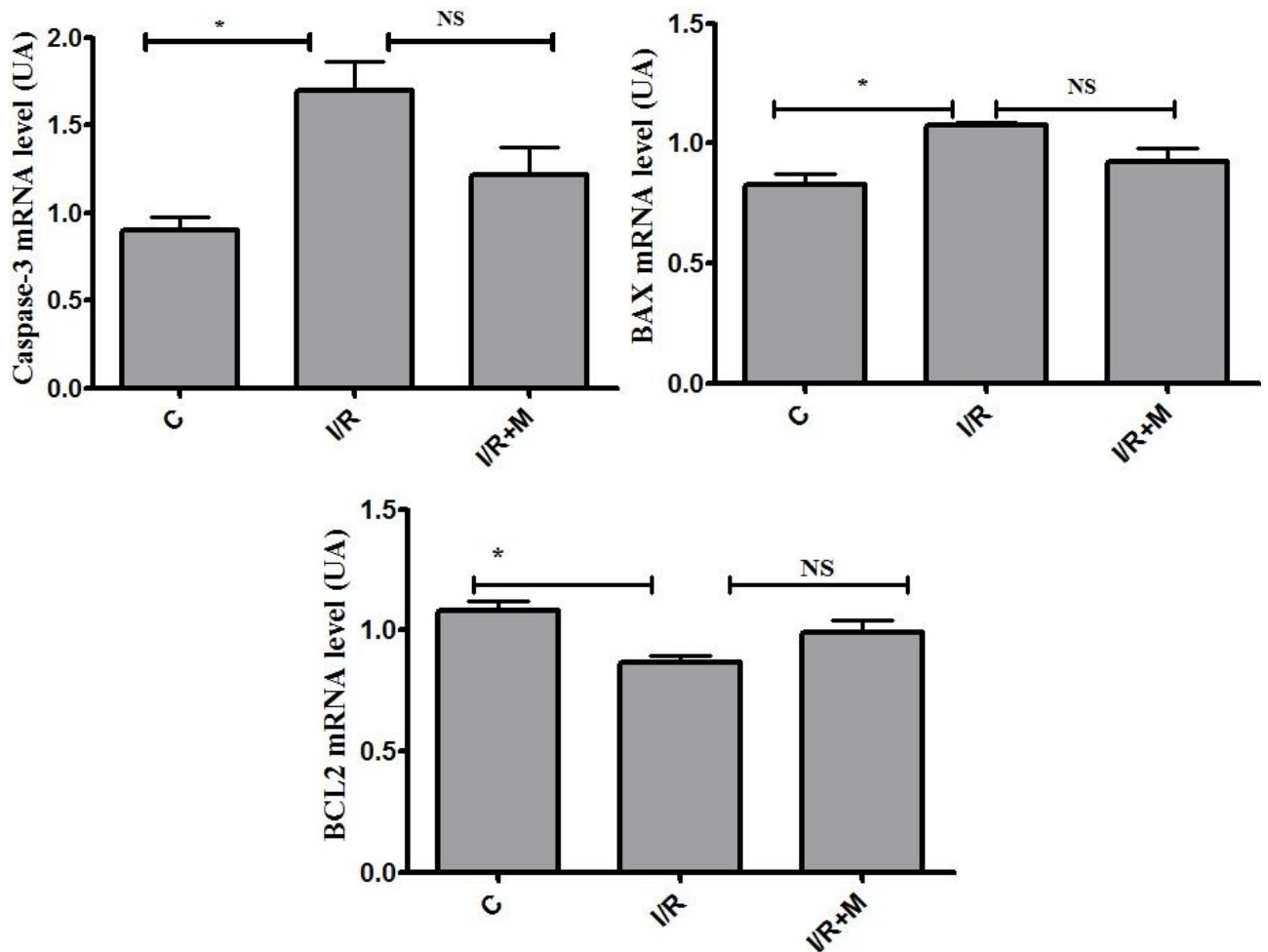


Рисунок 4.6 – Вплив метформіну на експресію генів каспаза 3, Вах та Bcl2 після ішемії-реперфузії

Примітка. Аналіз рівнів експресії генів каспаза 3, Вах та Bcl2 за допомогою ПЛР в реальному часі в міокарді мишей, яким проведено ішемію-реперфузію (I/R), або контрольної групи (C), при лікуванні метформіном (M) у дозі 5 мг/кг. * $p < 0,05$, NS – різниця недостовірна між вказаними групами.

Вірогідного впливу метформіну на експресію антиапоптичного гена Bcl2 не виявлено, проте спостерігається незначне збільшення рівня його мРНК на 14 % у групі (I/R+M) проти (I/R).

Отже, метформін проявляє антиапоптичну дію на кардіоміоцити при моделюванні ішемії-реперфузії у мишей, проте не чинить вірогідного впливу на експресію проапоптичних генів каспаза 3 і Вах та антиапоптичного Bcl2.

4.3 Вплив метформіну на процеси фіброзу після ішемії-реперфузії міокарда у мишей

Замісний фіброз на початкових етапах після ІМ відіграє захисну роль, проте, в кінцевому результаті, виникають незворотні, мальадаптивні зміни у шлуночку, що призводять до порушення серцевої функції [179].

Щоб дослідити вплив метформіну на процеси фіброзу у міокарді, зразки тканин міокарду були зафарбовані за допомогою сіріуса червоного і WGA, а також досліджено експресію профібротичних генів.

Гістологічне дослідження зрізів міокарда, зафарбованих сіріусом червоним, що забарвлює фіброзні волокна в червоний колір, продемонструвало (рис. 4.7), що ішемія-реперфузія достовірно збільшує відсоток фіброзної тканини у міокарді: $(12,26 \pm 3,36) \%$ у (I/R) групі проти $(0,33 \pm 0,07) \%$ у (C) групі, $p < 0,01$.

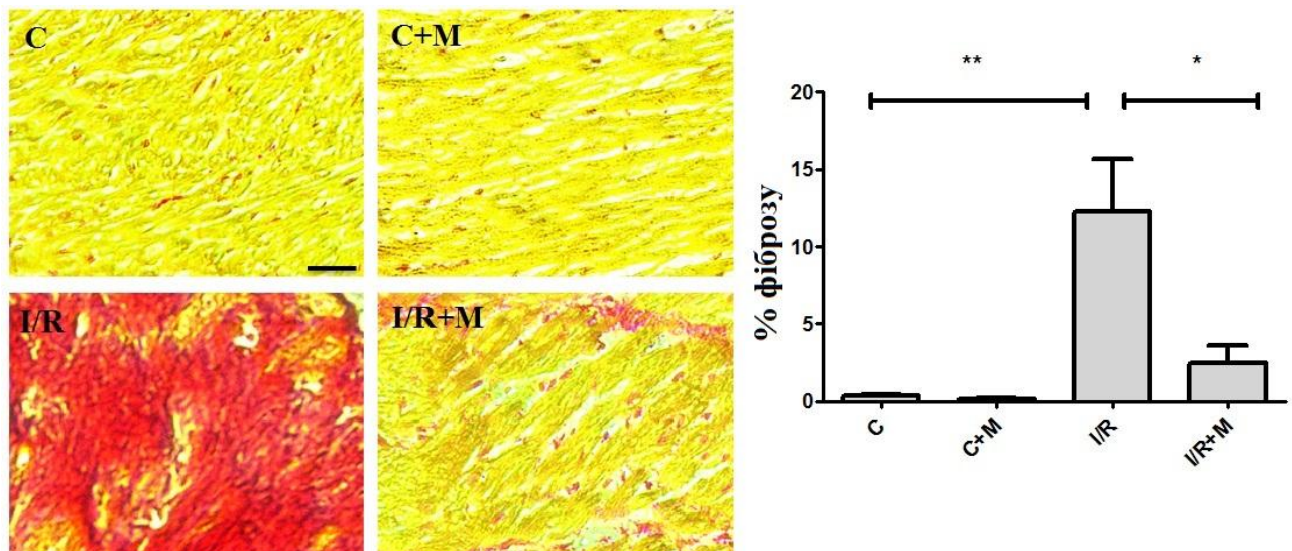


Рисунок 4.7 – Вплив метформіну на процеси фіброзу в міокарді, спровокованого ішемією-реперфузією (забарвлення сіріусом червоним)

Примітка. Зліва – репрезентативні зображення заморожених зрізів міокарда мишей, яким проведено ішемію-реперфузію (I/R), або контрольної групи (C), без або із лікуванням метформіном (M) у дозі 5 мг/кг, зафарбованих сіріусом червоним. Справа – результати визначення відносної кількості фіброзної тканини. Масштаб шкали 25 мкм. $**p < 0,01$, $*p < 0,05$ між вказаними групами.

Метформін не викликає структурних змін у серцевому м'язі при його введенні мишам, яким ішемія-реперфузія не проводилася: частка фіброзної тканини в зрізах міокарду тварин групи (C+M) становить $(0,16 \pm 0,01) \%$, що достовірно не відрізняється від контролю – $(0,33 \pm 0,07) \%$.

Лікування метформіном після ішемії-реперфузії призвело до достовірного зменшення відсотка фіброзної тканини у міокарді: $(2,49 \pm 1,13) \%$ у групі тварин із ішемією-реперфузією, пролікованих метформіном (I/R + M), проти $(12,26 \pm 3,36) \%$ у групі тварин із ішемією-реперфузією (I/R), $p < 0,05$.

Гістологічний аналіз зрізів міокарда, зафарбованих за допомогою WGA, що надає фіброзним волокнам яскраво-зеленого забарвлення, свідчить (рис. 4.8), що відсоток фіброзної тканини у міокарді після ішемії-реперфузії є достовірно більшим: $(14,43 \pm 1,95) \%$ у групі (I/R) проти $(0,35 \pm 0,05) \%$ у (C) групі, $p < 0,001$.

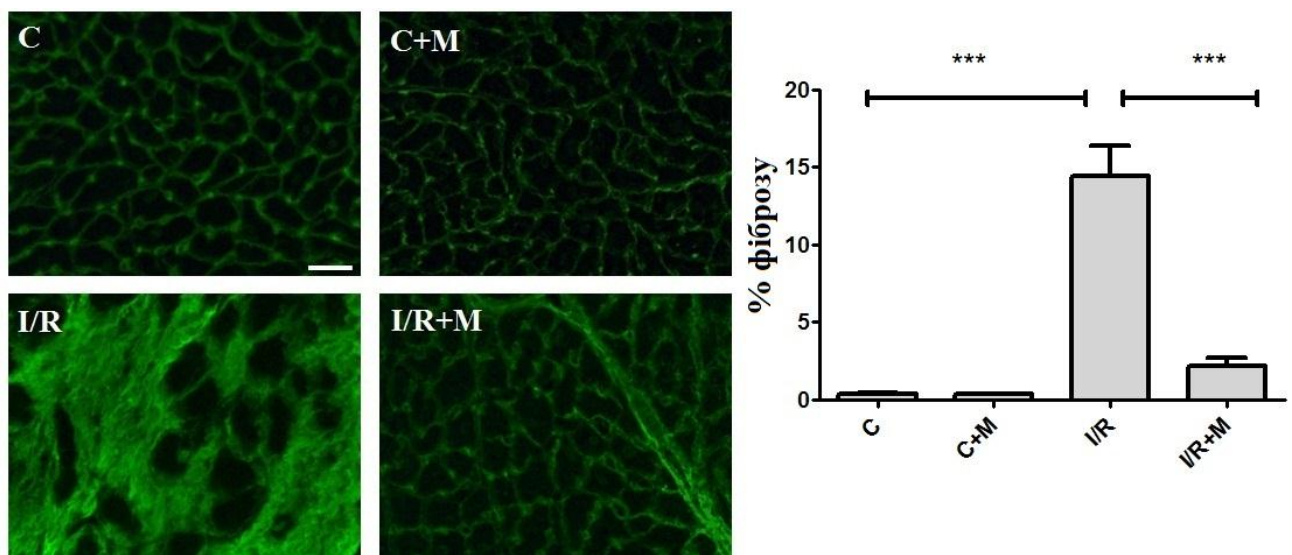


Рисунок 4.8 – Вплив метформіну на процеси фіброзу в міокарді, спровокованого ішемією-реперфузією (забарвлення WGA)

Примітка. Зліва – репрезентативні зображення заморожених зрізів міокарда мишей, яким проведено ішемію-реперфузію (I/R), або контрольної групи (C), без або із лікуванням метформіном (M) у дозі 5 мг/кг, зафарбованих за допомогою WGA. Справа – результати визначення відносної кількості фіброзної тканини. Масштаб шкали 25 мкм. *** $p < 0,001$ між вказаними групами.

Застосування метформіну у мишей, яким ураження серця не моделювали, не викликає фібротичних змін міокарда: частка фіброзної тканини в гістологічних препаратах у (С+М) групі становить $(0,34 \pm 0,05) \%$ проти $(0,35 \pm 0,05) \%$ у (С) групі.

Лікування метформіном після ішемії-реперфузії призвело до достовірного зменшення відсотка фіброзної тканини у міокарді: $(2,20 \pm 0,48) \%$ у групі тварин із ішемією-реперфузією, пролікованих метформіном (I/R + M), проти $(14,43 \pm 1,95) \%$ в групі тварин з ішемією-реперфузією (I/R), $p < 0,001$.

Фіброз міокарда асоційований із підвищеним накопиченням колагену типів I та III у адвентиції коронарних артерій (периваскулярний фіброз), який пізніше поширюється на інтерстицій (інтерстиціальний фіброз) [180]. TGF- β відіграє важливу роль у розвитку фіброзу при різноманітних запальних процесах та індукує експресію α SMA у фібробластах [181].

Враховуючи результати гістологічних досліджень, проаналізовано експресію основних прогіпертрофічних генів в умовах ішемії-реперфузії без або із лікуванням метформіном. Встановлено, що ішемія-реперфузія провокує підвищення функції генів Col3A1 – на 75 %, $p < 0,01$, α SMA – на 98 %, $p < 0,05$ (рис. 4.9), Col1A1 – на 70,9 %, $p < 0,05$, і TGF- β_1 – на 35 %, $p < 0,05$ (4.10).

У мишей, лікованих метформіном, надмірна експресія генів α SMA та COL3A1, обумовлена ішемією-реперфузією, була зменшена на 32,3 %, $p < 0,05$, та 40,5 %, $p < 0,05$, відповідно.

Водночас рівень експресії мРНК гена COL1A1 при лікуванні ішемії-реперфузії метформіном залишився незмінним, а TGF- β_1 – зменшився на 12 %, проте результат є недостовірним.

Отже, метформін у дозі 5 мг/кг, введений інтраперитонеально упродовж 14 днів після ішемії-реперфузії, змешує фіброз міокарду, зокрема, шляхом попередження ап-регуляції генів α SMA та COL3A1. Достовірного впливу на експресію TGF- β_1 та COL1A1 не виявлено.

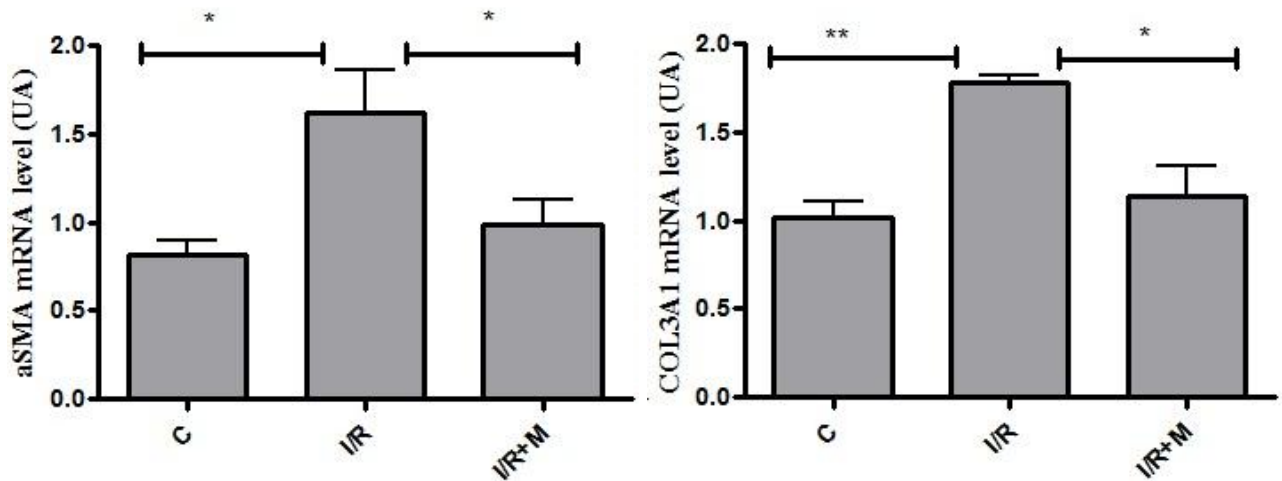


Рисунок 4.9 – Вплив метформіну на експресію генів α SMA та COL3A1 після ішемії-реперфузії

Примітка. Аналіз рівнів експресії генів α SMA та COL3A1 за допомогою ПЛР в реальному часі в міокарді мишей, яким проведено ішемію-реперфузію (I/R), або контрольної групи (C), при лікуванні метформіном (M) у дозі 5 мг/кг. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ між вказаними групами.

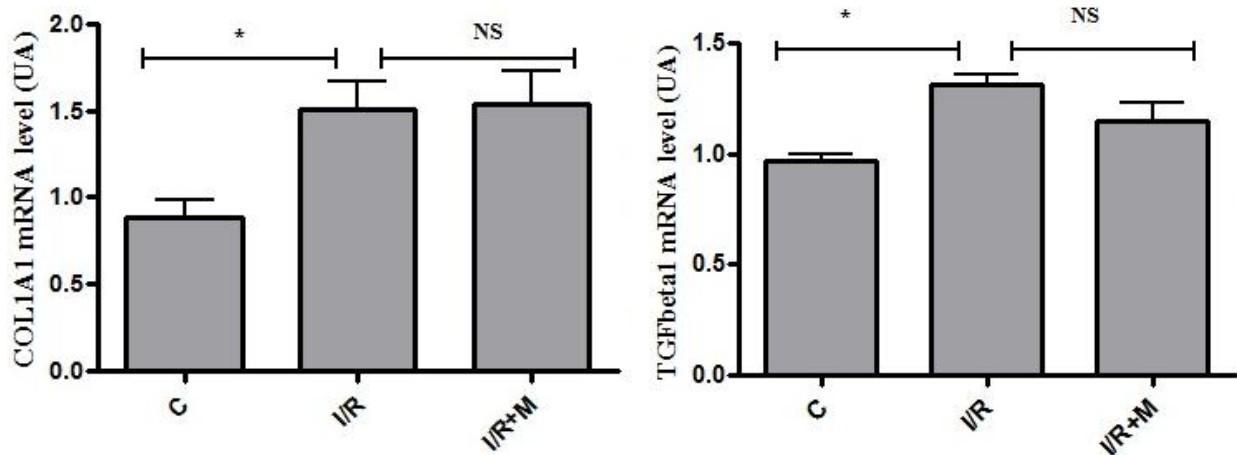


Рисунок 4.10 – Вплив метформіну на експресію генів TGF- β_1 та COL1A1 після ішемії-реперфузії

Примітка. Аналіз рівнів експресії генів TGF- β_1 та COL1A1 за допомогою ПЛР в реальному часі в міокарді мишей, яким проведено ішемію-реперфузію (I/R), або контрольної групи (C), при лікуванні метформіном (M) у дозі 5 мг/кг. * $p < 0,05$, NS – різниця недостовірна між вказаними групами.

4.4 Вивчення протизапального ефекту препарату метформін після ішемії-реперфузії міокарда у мишей

Для оцінки протизапального потенціалу метформіну проведено імуногістохімічний аналіз за допомогою анти-CD68 антитіл у зразках тканин міокарду та досліджено експресію генів, відповідальних за запальні процеси.

CD68 використовується як цитохімічний маркер для виявлення моноцитів та макрофагів у гістохімічних дослідженнях. Встановлено, що експресія CD68 у макрофагах підвищується при наявності запальних стимулів [104].

На рис. 4.11 наведені результати імуногістохімічного дослідження експресії глікопротеїна CD68, маркера макрофагів, який світиться червоним або оранжевим кольором, у тканинах серцевого м'яза.

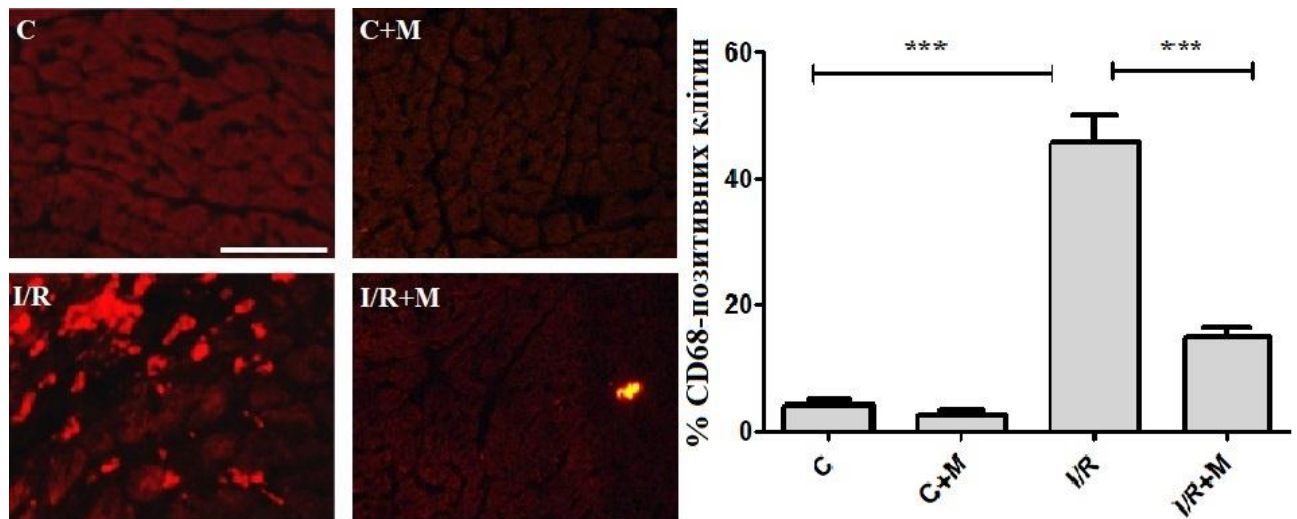


Рисунок 4.11 – Імуногістохімічне дослідження впливу метформіну на кількість CD68-позитивних клітин у міокарді після ішемії-реперфузії

Примітка. Зліва – репрезентативні зображення CD68-позитивних клітин у заморожених зрізах міокарда мишей, яким проведено ішемію-реперфузію (I/R), або контрольної групи (C), без або із лікуванням метформіном (M) у дозі 5 мг/кг. Справа – результати підрахунку кількості CD68 позитивних клітин. Масштаб шкали 25 мкм. *** $p < 0,001$ між вказаними групами.

В міокарді, ураженому ішемією-реперфузією, виявлено достовірно більшу кількість CD68-позитивних клітин, у порівнянні із тканинами, отриманими від

здорових тварин: $(45,84 \pm 4,27)$ у групі (I/R) проти $(4,12 \pm 0,76)$ у (C) групі, $p < 0,001$.

Введення метформіну мишам, яким ураження міокарду не моделювали, не викликало достовірних змін у експресії CD68-позитивних клітин: $(2,58 \pm 0,77)$ у (C+M) групі проти $(4,12 \pm 0,76)$ у (C) групі.

Лікування метформіном після ішемії-реперфузії призвело до зменшення кількості макрофагів у міокарді: $(14,93 \pm 1,65)$ у групі тварин із ішемією-реперфузією, пролікованих метформіном (I/R + M), проти $(45,84 \pm 4,27)$ у групі тварин із ішемією-реперфузією (I/R), $p < 0,001$.

Водночас досліджено експресію гена CD68 у тканині міокарда після ішемії-реперфузії із або без лікування метформіном (рис. 4.12). Встановлено, що ішемія-реперфузія провокує ап-регуляцію гена, відповідального за синтез глікопротеїна CD68, збільшуючи рівень його мРНК на 74,1 %, $p < 0,01$. Лікування метформіном достовірно зменшує експресію CD68 гена на 34,8 %, $p < 0,05$.

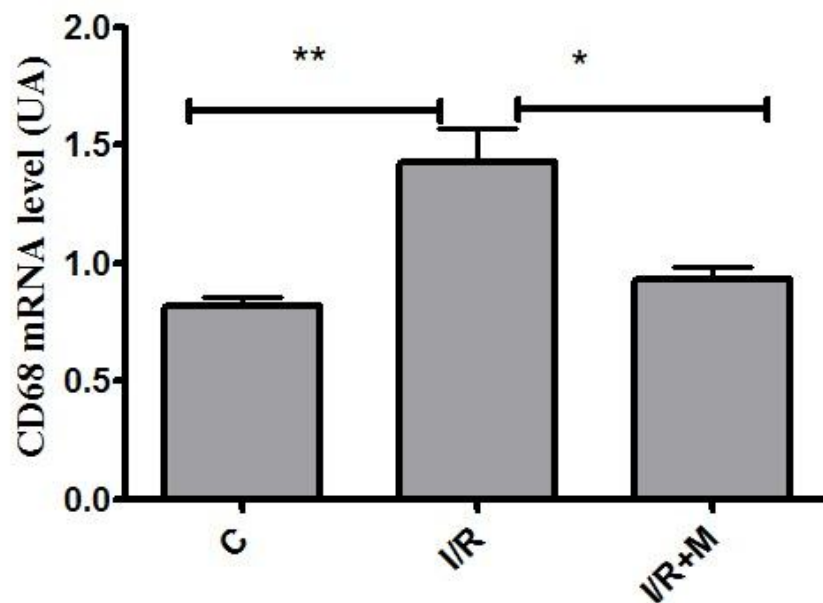


Рисунок 4.12 – Вплив метформіну на експресію гена CD68 після ішемії-реперфузії

Примітка. Аналіз рівнів експресії гена CD68 за допомогою ПЛР в реальному часі в міокарді мишей, яким проведено ішемію-реперфузію (I/R), або контрольної групи (C), при лікуванні метформіном (M) у дозі 5 мг/кг. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ між вказаними групами.

Прозапальні цитокіни TNF- α та IL-6 є основними регуляторами гострої фази запалення, їх синтез у міокарді після інфаркту асоціюється із процесами ремоделювання [105]. Моноцитарний хемоатрактний протеїн-1 (MCP-1), який виділяється клітинами у відповідь на стрес, сприяє міграції моноцитів і макрофагів та їх накопиченню в зоні ураження. Проте високі рівні MCP-1 у сироватці після ІМ асоціюються із підвищеним ризиком виникнення раптової кардіальної смерті [182].

За допомогою ПЛР у реальному часі досліджено вплив метформіну на експресію генів TNF- α , IL-6 та MCP-1 у зразках міокарду мишей після ішемії-реперфузії (рис. 4.13).

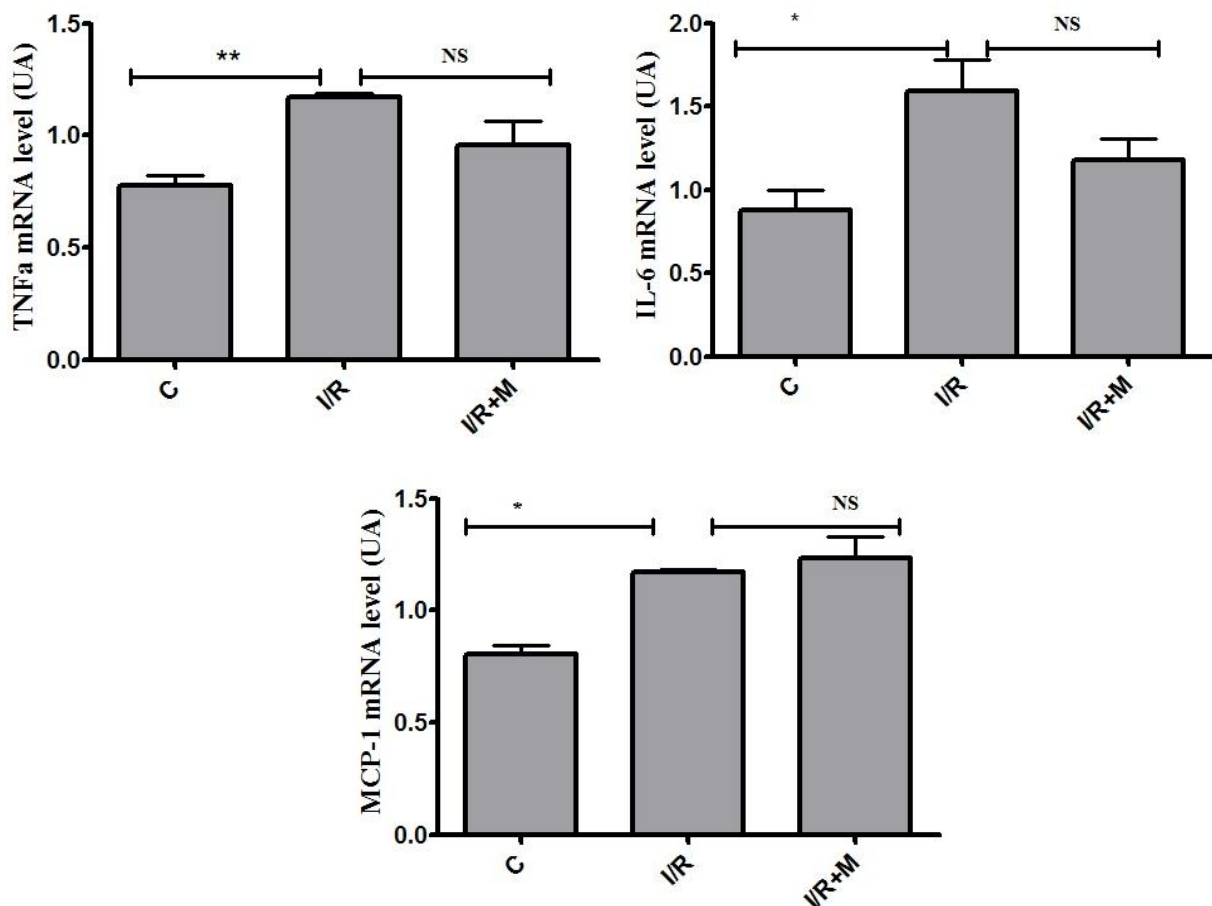


Рисунок 4.13 – Вплив метформіну на експресію генів TNF- α , IL-6 та MCP-1 після ішемії-реперфузії

Примітка. Аналіз рівнів експресії генів TNF- α , IL-6 та MCP-1 за допомогою ПЛР в реальному часі в міокарді мишей, яким проведено ішемію-реперфузію (I/R), або контрольної групи (C), при лікуванні метформіном (M) у дозі 5 мг/кг. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, NS – різниця недостовірна між вказаними групами.

Встановлено, що ішемія-реперфузія достовірно викликає підвищення експресії прозапальних генів у міокарді: TNF- α – на 51,4 %, $p < 0,01$, IL-6 – на 81,4 %, $p < 0,05$, та MCP-1 – на 45 %, $p < 0,05$.

Лікування метформіном сприяє зменшенню рівнів мРНК TNF- α та IL-6, ап-регульованих ішемією-реперфузією, на 18,3 % та 27 %, проте ці зміни недостовірні. Вміст мРНК MCP-1 збільшився на 5,5 % при застосуванні метформіну, як порівняти з нелікованими мишами, проте результат не є вірогідним.

Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлено, що:

- метформін володіє вираженим антигіпертрофічним впливом на кардіоміоцити при моделюванні ішемії-реперфузії у мишей. Препарат інгібує індуковану ішемією-реперфузією апрегуляцію BNP та не впливає на експресію генів α - та β -МНС;
- метформін захищає кардіоміоцити мишей від індукованого ішемією-реперфузією апоптозу. У той же час впливу препарату на функцію генів Bax, Bcl2 та каспаза-6 не виявлено, тому подальшого вивчення вимагає питання встановлення механізмів реалізації його ефектів;
- метформін зменшує фіброз у тканині міокарду після моделювання ішемії-реперфузії у мишей шляхом попередження ап-регуляції генів α SMA та COL3A1. Достовірного впливу метформіну на експресію генів TGF- β_1 та COL1A1 не встановлено;
- метформін проявляє протизапальний ефект у зоні некрозу в міокарді, що виник внаслідок ішемії-реперфузії у мишей, зокрема, попереджаючи ап-регуляцію гена CD68 та змешуючи експресію одноіменного глікопротеїна. Експресія генів TNF- α , IL-6 та MCP-1 після ішемії-реперфузії та лікування метформіном не зазнає достовірних змін.

Результати досліджень, які викладені у даному розділі, знайшли відображення у друкованих працях автора [163, 183] та доповідалися на конференціях: [184, 185].

РОЗДІЛ 5

КАРДІОПРОТЕКТИВНІ ЕФЕКТИ ПРЕПАРАТУ МЕТФОРМІН ПРИ ІЗОПРОТЕРЕНОЛ-ІНДУКОВАНОМУ УРАЖЕННІ МІОКАРДА У ЩУРІВ ІЗ НОРМАЛЬНОЮ МАСОЮ ТІЛА АБО ОЖИРІННЯМ

Глобальне зростання рівня асоційованих із ожирінням серцево-судинних ускладнень є одним із основних викликів для системи охорони здоров'я в усьому світі. Ожиріння пов'язане із широким спектром змін у метаболічному статусі та кардіальному фенотипі, що проявляється зниженою скоротливістю і гіпертрофією лівого шлуночка, СН [161] та підвищеним ризиком інфаркту міокарда в популяції, навіть при відсутності метаболічних порушень [186].

Ще однією вагомою ланкою, залученою у розвиток кардіальної патології, є симпатoadреналова система [187]. Відомо, що у пацієнтів із ЦД як наслідок нейропатичних ускладнень виникає дисфункція автономної регуляції, а діяльність серця характеризується надмірною симпатичною стимуляцією [188].

В наступній серії експериментів ми досліджували кардіопротективні ефекти метформіну у щурів породи Вістар із нормальною масою тіла або з ожирінням при моделюванні кардіоміопатії. Щоб викликати ожиріння, щурі отримували дієту із вмістом жирів у раціоні 45% упродовж 28 днів, яка продовжувалася наступні 7 днів, коли щурам інтраперитонеально вводили ізопротеренол у дозі 5 мг/кг та/або метформін у дозі 100 мг/кг.

5.1 Вплив метформіну на масу тіла та стан ліпідного обміну у щурів, які отримували високожирову дієту

Ожиріння супроводжується інсулінорезистентністю [189], яка є основною причиною виникнення ЦД 2 типу та інших ознак метаболічного синдрому, таких як дисліпідемія та артеріальна гіпертензія, тому зменшення маси тіла є потенційною стратегією у профілактиці розвитку цих порушень [190].

На рис. 5.1 наведені показники маси тіла щурів контрольної групи (С) та тих, що отримували дієту із вмістом жирів 45 % у добовому раціоні (HFD), у перший та на 28 день експерименту. У щурів (С) групи за результатами масометрії вірогідних змін через 4 тижні не виникає: середня маса тіла в 1 день – $(230,50 \pm 3,74)$ г проти $(241,80 \pm 3.60)$ г на 28 день. Встановлено, що маса тіла щурів у групі (HFD) достовірно збільшується на 20,3 % і становить $(252,9 \pm 5,6)$ г на 28 день експерименту проти $(210,2 \pm 2.9)$ г до початку дієти, $p < 0,001$.

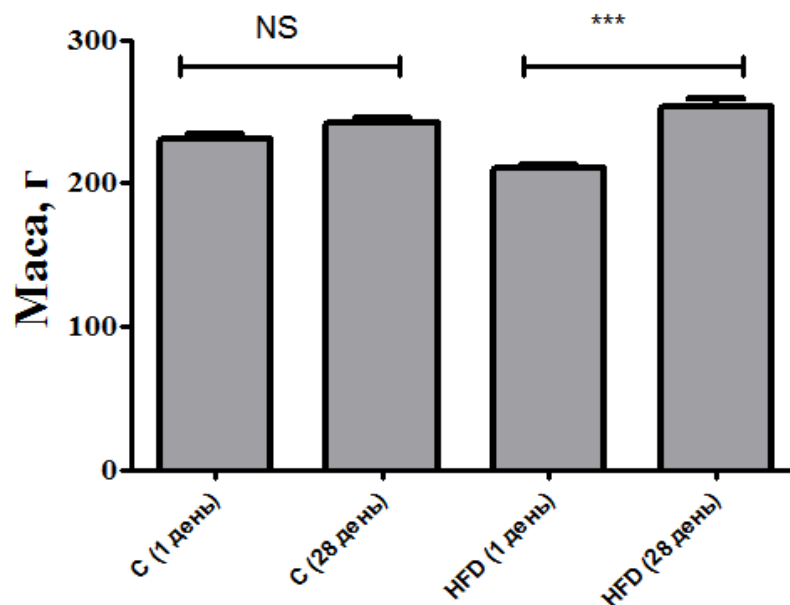


Рисунок 5.1 – Вплив високожирової дієти на масу тіла у щурів

Примітка. Динаміка маси тіла у щурів контрольної групи (С) та при застосуванні високожирової дієти (HFD) на початку експерименту та через 28 днів. *** $p < 0,001$, NS – різниця недостовірна між вказаними групами.

Лікування щурів метформіном (М) у дозі 100 мг/кг упродовж 7 днів попереджає подальше збільшення маси тіла, спостерігається динаміка до її зниження ($250,7 \pm 9,4$ г проти $239,3 \pm 9,2$ г), проте результат недостовірний (рис 5.2), що може бути зумовлено відносно коротким терміном застосування препарату.

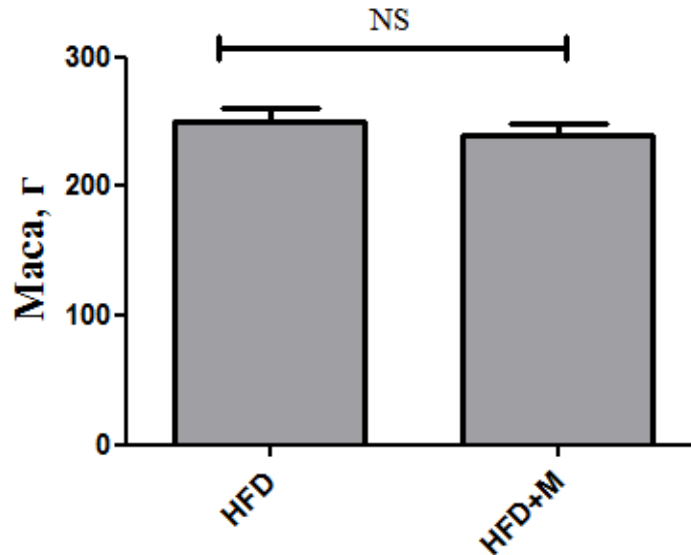


Рисунок 5.2 – Вплив метформіну на масу тіла щурів при високожировій дієті

Примітка. Динаміка маси тіла у щурів з ожирінням до та після застосування метформіну упродовж 7 днів. NS – різниця недостовірна між вказаними групами.

Пацієнти із ЦД 2 типу мають підвищений ризик виникнення атеросклерозу, що пов'язано із високим рівнем глюкози, дисліпідемією та надмірним депонуванням жирової тканини [191].

У наступній серії досліджень з'ясовано вплив метформіну на ліпідний спектр крові щурів із ожирінням, індукованим високожировою дієтою. В таблиці 5.1 наведені середні значення показників ліпідного спектру крові щурів в кожній групі. На рисунку 5.3 відображені зміни показників ліпідограми щурів з нормальною масою тіла або ожирінням та ізопротереноловою кардіоміопатією при лікуванні метформіном.

Після 35 днів застосування високожирової дієти у щурів виникає дисліпідемія. Достовірно підвищені сироваткові рівні загального холестеролу: на 80,3 % у групі (HFD), $p < 0,001$, і на 68,9 % у групі (HFD+Iso), $p < 0,001$, триацилгліцеролу: на 76,9 % у групі (HFD), $p < 0,001$, і на 42,9 % у групі (HFD+Iso), $p < 0,001$, та ЛПНЩ: на 40,9 % у групі (HFD), $p < 0,01$, і на 43,2 % у групі (HFD+Iso), $p < 0,001$, а вміст ЛПВЩ – знижений: на 10,5 % у групі (HFD) і на 15,8 % у групі (HFD+Iso), але різниця недостовірна.

Таблиця 5.1 – Вплив метформіну на ліпідний спектр крові щурів із ожирінням, індукованим високожировою дієтою

| Серії | ЗХ, ммоль/л | Триацилгліцерол, ммоль/л | ЛПНЩ, ммоль/л | ЛПВЩ, ммоль/л |
|------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------|
| С | 1,22 ± 0,04 | 0,91 ± 0,01 | 0,44 ± 0,02 | 0,38 ± 0,02 |
| С+М | 1,19 ± 0,03 | 0,89 ± 0,03 | 0,43 ± 0,02 | 0,40 ± 0,03 |
| HFD | 2,20 ± 0,14 ^{***} | 1,61 ± 0,08 ^{***} | 0,62 ± 0,04 ^{**} | 0,34 ± 0,03 |
| HFD+М | 1,95 ± 0,16 | 1,14 ± 0,04 ⁺⁺⁺ | 0,51 ± 0,04 | 0,41 ± 0,02 |
| Iso | 1,33 ± 0,03 | 0,88 ± 0,02 | 0,48 ± 0,02 | 0,37 ± 0,02 |
| Iso+М | 1,28 ± 0,02 | 0,90 ± 0,02 | 0,49 ± 0,02 | 0,41 ± 0,02 |
| HFD+Iso | 2,06 ± 0,07 ^{***} | 1,31 ± 0,04 ^{***} | 0,63 ± 0,04 ^{***} | 0,32 ± 0,02 |
| HFD+Iso +М | 2,00 ± 0,08 | 0,88 ± 0,02 ^{\$\$\$} | 0,56 ± 0,02 | 0,39 ± 0,02 |

Примітка 1. С – нормальна дієта, С+М – нормальна дієта + метформін, HFD – високожирова дієта, HFD+М – високожирова дієта + метформін, Iso – нормальна дієта + ізопротеренол, Iso+М – нормальна дієта + ізопротеренол + метформін, HFD+Iso – високожирова дієта + ізопротеренол, HFD+Iso +М – високожирова дієта + ізопротеренол + метформін.

Примітка 2. ***p<0,001, **p<0,01 проти контрольної групи; +++p<0,001 проти HFD, \$\$\$p<0,001проти HFD+Iso, NS – різниця недостовірна між вказаними групами.

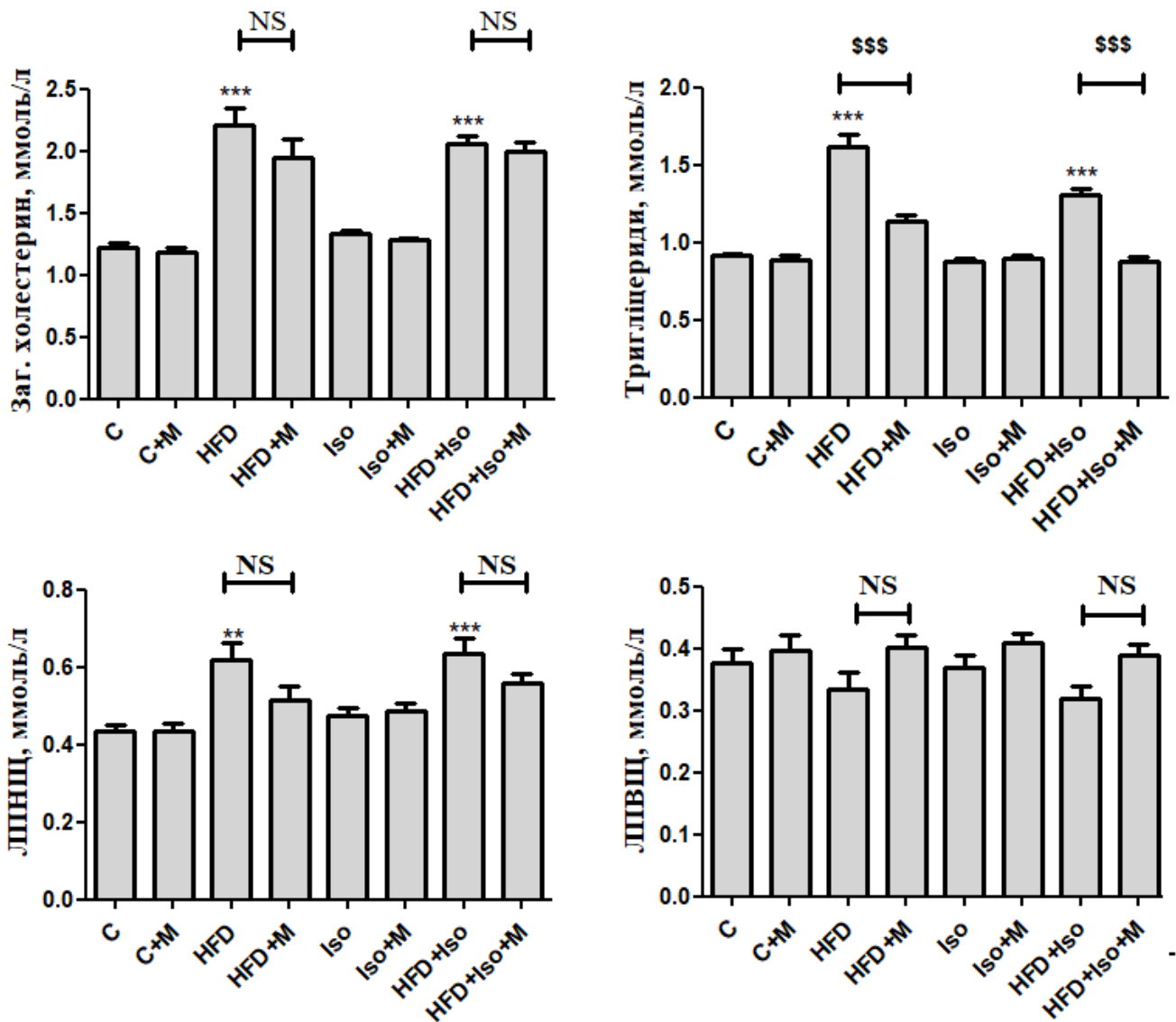


Рисунок 5.3 – Зміни показників ліпідограма щурів з ожирінням та ізопротереноловою кардіоміопатією при лікуванні метформіном

Примітка. Показники загального холестеролу, триацилгліцеролу, ЛПНЩ та ЛПВЩ у щурів, що отримували нормальну (C) або високожирову дієту (HFD) та ін'єкції ізопротеренолу (Iso), при лікуванні метформіном (M). Дослідження здійснене колориметричним методом. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ проти контрольної групи; \$\$\$ $p < 0,001$, NS – різниця недостовірна між вказаними групами.

У щурів, пролікованих метформіном, концентрація ЛПВЩ підвищується, а загального холестеролу і ЛПНЩ – знижується, проте лише рівень триацилгліцеролу зазнає достовірного зменшення: $(1,61 \pm 0,08)$ ммоль/л у групі (HFD) проти $(1,14 \pm 0,04)$ ммоль/л у групі (HFD+M) та $(1,30 \pm 0,04)$ ммоль/л у групі (HFD+Iso) проти $(0,88 \pm 0,02)$ ммоль/л групі (HFD+Iso+M), $p < 0,001$.

Отже, лікування метформіном у дозі 100 мг/кг упродовж 7 днів у щурів запобігає збільшенню маси тіла та попереджує виникнення гіпертригліцеридемії, що свідчить про здатність метформіну зменшувати ризик виникнення серцево-судинної патології.

5.2 Вплив метформіну на гіпертрофію, фіброз та експресію мозкового натрійуретичного пептиду при ізопротеренол-індукованому ураженні міокарда у щурів із нормальною масою тіла або ожирінням

Оскільки у пацієнтів із ЦД переважає симпатичний тонус, це призводить до підвищеного ризику виникнення ремоделювання міокарда [188]. Надмірна активність адренергічної системи підвищує ризик гіпертрофії лівого шлуночка та фіброзу і є однією із ключових патофізіологічних ознак у пацієнтів із СН [192]. Шляхом застосування ізопротеренолу у низькій дозі (5 мг/кг) упродовж 7 днів, як описано раніше [193], відтворено ураження серцевого м'яза, що виникає у пацієнтів при хронічній адренергічній гіперактивності.

На рисунку 5.4 продемонстровано вплив метформіну на гіпертрофію кардіоміоцитів у щурів з ожирінням та ізопротереноловою кардіоміопатією. Достовірне збільшення площі кардіоміоцитів спостерігається у тварин, що отримували ін'єкції ізопротеренолу (Iso): $(482,60 \pm 8,78)$ мкм² у групі (Iso) та $(655,10 \pm 12,70)$ мкм² у групі (HFD+Iso) проти $(222,30 \pm 3,85)$ мкм² у (C) групі, $p < 0,001$.

При тому, у групі тварин з ожирінням (HFD+Iso) середня площа клітин на 35,74 % більша, ніж у таких із нормальною масою тіла (Iso). Важливо, що гіпертрофія виявлена навіть у щурів з ожирінням, викликаним високожировою дієтою, які не отримували ін'єкцій ізопротеренолу (HFD), що свідчить про негативний вплив надмірного споживання жирів на стан серцево-судинної системи: $(337,0 \pm 5,45)$ мкм² у групі (HFD) проти $(222,3 \pm 3,85)$ мкм² у (C) групі, $p < 0,001$.

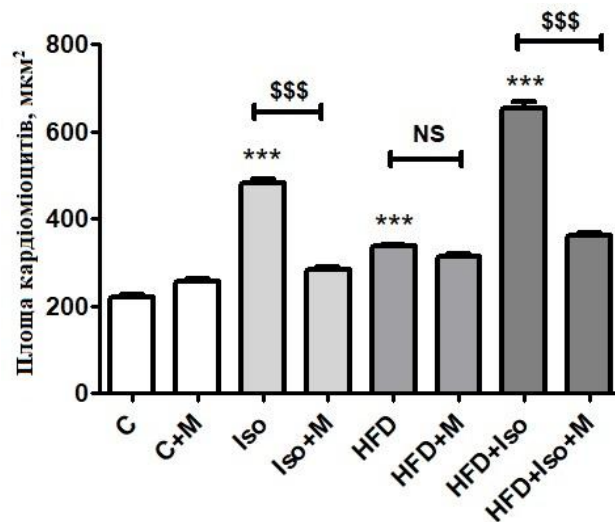
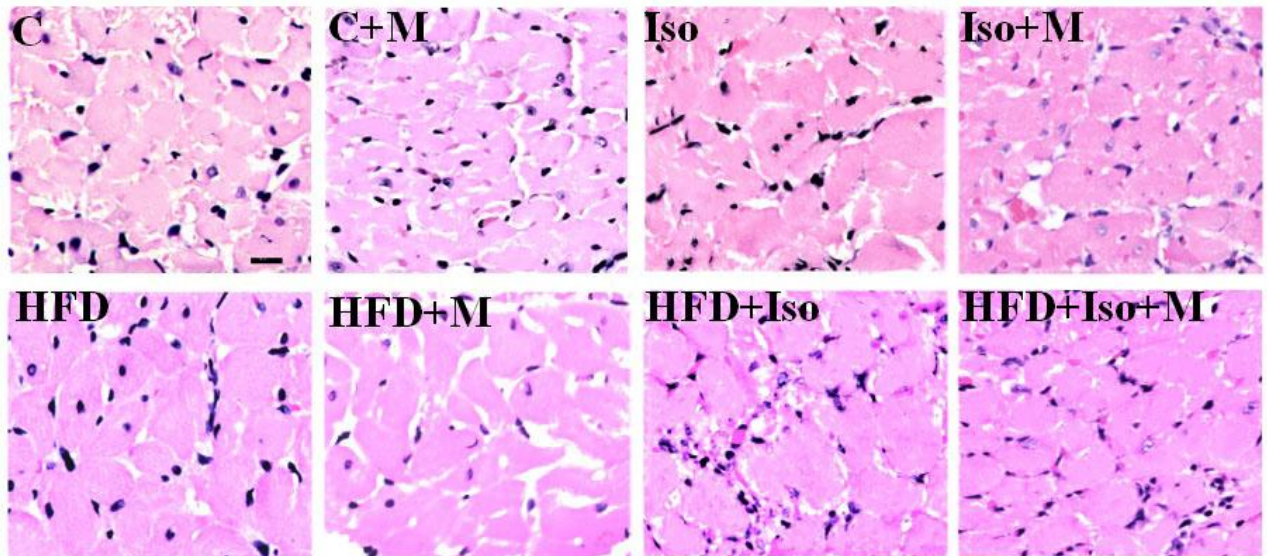


Рисунок 5.4 – Вплив метформіну на гіпертрофію кардіоміоцитів при ізопротеренол-індукованому ураженні міокарда у щурів із нормальною масою тіла або ожирінням

Примітка. Зверху – репрезентативні зображення зрізів міокарда від щурів, що отримували нормальну (C) або високожирову дієту (HFD) та ін'єкції ізопротеренолу (Iso), при лікуванні метформіном (M). Внизу – результати морфометрії кардіоміоцитів. Масштаб шкали 10 мкм. *** $p < 0,001$ проти контрольної групи; \$\$\$ $p < 0,001$, NS – різниця недостовірна між вказаними групами.

Введення метформіну щурам без змодельованої патології не викликає структурних змін у міокарді: площа кардіоміоцитів у групі (C+M) становить $(259,9 \pm 6,70)$ мкм² проти $(222,3 \pm 3,85)$ мкм² у (C) групі, різниця недостовірна.

Лікування метформіном попереджає гіпертрофічні зміни у кардіоміоцитах при моделюванні ізопротеренолової кардіоміопатії у щурів як із нормальною масою тіла, так і з ожирінням: $(285,10 \pm 4,25)$ мкм² у групі (Iso+M) проти $(482,60 \pm 8,78)$ мкм² у групі (Iso) та $(363,40 \pm 5,36)$ мкм² у групі (HFD+Iso+M) проти $(655,10 \pm 12,70)$ мкм² у групі (HFD+Iso), $p < 0,001$.

Водночас метформін вірогідно не запобігає надмірному збільшенню кардіоміоцитів у щурів із ожирінням, що не отримували ін'єкцій ізопротеренолу: $(313,80 \pm 5,29)$ мкм² у групі (HFD+M) проти $(337,0 \pm 5,45)$ мкм² у групі (HFD).

Результати гістологічних досліджень, що свідчать про антигіпертрофічні властивості метформіну на міокард щурів, були підтверджені імуноферментним аналізом концентрації BNP у сироватці крові.

Відомо, що стимуляція β_1 адренорецепторів, поряд із гіпертрофією кардіоміоцитів, провокує надмірний синтез протеїнів та запускає ап-регуляцію генів ранньої відповіді та експресію фетальних генів, зокрема BNP [194].

На рисунку 5.5 наведені результати визначення концентрації BNP у сироватці крові щурів імуноферментним методом.

Встановлено, що введення ізопротеренолу провокує зростання концентрації BNP сироватки крові у щурів як з нормальною масою тіла (на 85,5 %), так і з ожирінням (більш, ніж вдвічі): $(187,70 \pm 8,25)$ пг/мл в групі (Iso) та $(236,70 \pm 15,70)$ пг/мл у групі (HFD+Iso) проти $(101,20 \pm 5,44)$ пг/мл у (C) групі, $p < 0,001$. Проте сироватковий рівень BNP у щурів з ожирінням без ізопротеренолової кардіоміопатії не зазнає достовірних змін, хоча морфогістологічно гіпертрофія виявлена: $(127,30 \pm 3,98)$ пг/мл у групі (HFD) проти $(101,20 \pm 5,44)$ пг/мл у (C) групі.

Лікування метформіном призводить до зниження концентрації BNP у щурів з ізопротереноловою кардіоміопатією та з ожирінням (вдвічі) або без нього (на 30 %), як порівняти з нелікованими тваринами: $(131,30 \pm 2,82)$ пг/мл

у групі (Iso+M) проти $(187,70 \pm 8,25)$ пг/мл у групі (Iso) та $(118,20 \pm 5,35)$ пг/мл у групі (HFD+Iso+M) проти $(236,70 \pm 15,70)$ пг/мл у групі (HFD+Iso), $p < 0,001$.

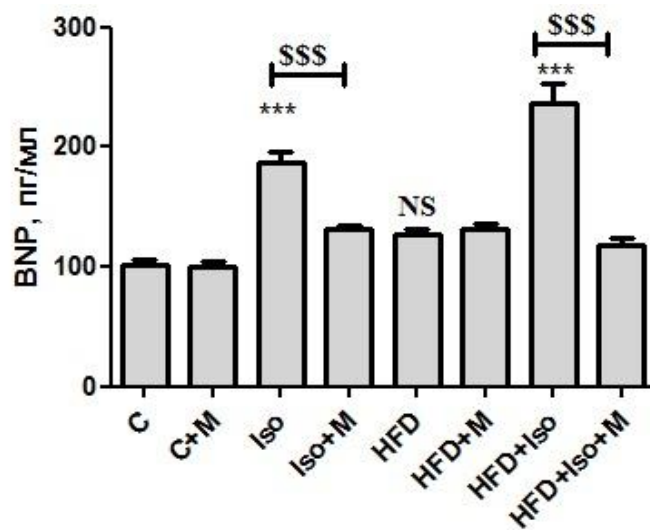


Рисунок 5.5 – Вплив метформіну на концентрацію BNP у сироватці крові щурів із нормальною масою тіла або ожирінням при ізопротеренол-індукованому ураженні міокарда

Примітка. Концентрація BNP у сироватці крові щурів, що отримували нормальну (C) або високожирову дієту (HFD) та ін'єкції ізопротеренолу (Iso), при лікуванні метформіном (M), визначена імуноферментним методом. *** $p < 0,001$, NS – різниця недостовірна проти контрольної групи; \$\$\$ $p < 0,001$ між вказаними групами.

Застосування метформіну у щурів без змодельованої патології вірогідно не впливає на рівень сироваткового BNP: $(99,71 \pm 4,99)$ пг/мл у групі (C+M) проти $(101,20 \pm 5,44)$ пг/мл у (C) групі.

Тривале застосування ізопротеренолу викликає виражені фіброзні зміни в міокарді, що врешті призводять до дисфункції ЛШ [195]. Тому запобігання фіброзному ремоделюванню серцевого м'яза є потенційною терапевтичною мішенню у лікуванні СН [196].

На рисунку 5.6 відображено розростання фіброзних волокон, забарвлених за допомогою гематоксиліну та еозину в фіолетовий колір, у міокарді щурів з ізопротереноловою кардіоміопатією та нормальною масою тіла або ожирінням.

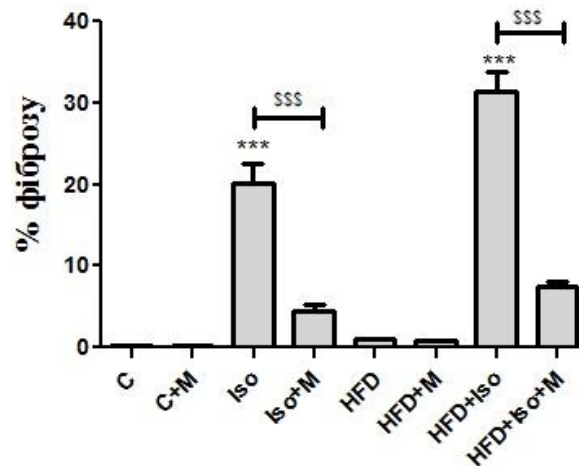
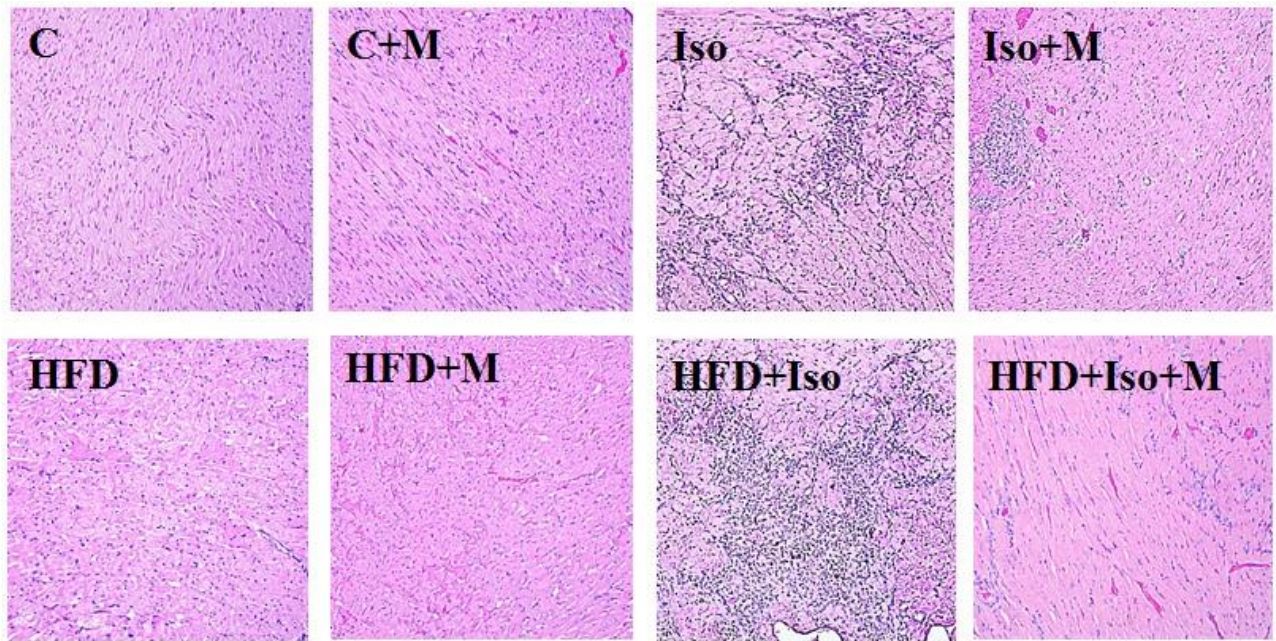


Рисунок 5.6 – Вплив метформіну на процеси фіброзу при ізопротеренол-індукованому ураженні міокарда у шурів із нормальною масою тіла або ожирінням

Примітка. Зверху – репрезентативні зображення кардіальних секцій від шурів, що отримували нормальну (C) або високожирову дієту (HFD) та ін'єкції ізопротеренолу (Iso), при лікуванні метформіном (M). Внизу – результати вимірювання відносної кількості фіброзної тканини у препаратах. *** $p < 0,001$ проти контрольної групи; \$\$\$ $p < 0,001$ – різниця недостовірна між вказаними групами.

Встановлено, що у міокарді тварин, які отримували високожирову дієту без моделювання кардіоміопатії (HFD), процеси фіброзу не посилені. Проте введення ізопротеренолу призводить до масивного накопичення фіброзної тканини у міокарді: $(20,20 \pm 2,25) \%$ у групі (Iso) та $(31,40 \pm 2,31) \%$ у групі (HFD+Iso) проти $(0,31 \pm 0,05) \%$ у (C) групі, $p < 0,001$. Тобто, у тварин із

ожирінням фіброзне ремоделювання на 55 % більш виражене, ніж у таких із нормальною масою тіла.

Метформін запобігає накопиченню фіброзної тканини при моделюванні ізопротеренолової кардіоміопатії у щурів як із нормальною масою тіла, так і з ожирінням: ($4,54 \pm 0,68$) % у групі (Iso+M) проти ($20,20 \pm 2,25$) % у групі (Iso) та ($7,42 \pm 0,73$) % у групі (HFD+Iso+M) проти ($31,40 \pm 2,31$) % у групі (HFD+Iso), $p < 0,001$.

Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлено, що:

- метформін у дозі 100 мг/кг упродовж 7 днів запобігає подальшому збільшенню маси тіла у щурів з ожирінням, що отримували високожирову дієту упродовж 28 днів до та ще 1 тиждень під час лікування, проте достовірного зниження маси тіла не встановлено;
- у щурів із ожирінням, індукованим високожировою дієтою, виявлено надмірну концентрацію загального холестеролу, триацилгліцеролу та ЛПНЩ у сироватці крові, проте лікування метформіном сприяє достовірному зниженню рівня триацилгліцеролу, у порівнянні із нелікованими тваринами;
- гіпертрофія кардіоміоцитів виникає при введенні ізопротеренолу у щурів із нормальною масою тіла та при ожирінні, при чому ожиріння провокує інтенсивніший ріст клітин; гіпертрофія міокарду виявлена також у тварин з ожирінням, яким ізопротеренол не застосовували; метформін попереджає надмірний ріст кардіоміоцитів у щурів з ізопротеренол-індукованим ураженням серцевого м'яза, проте достовірного впливу на площу клітин у тварин з ожирінням не встановлено;
- концентрація мозкового натрійуретичного пептиду у плазмі крові усіх нелікованих щурів, що отримували ізопротеренол, достовірно підвищена, що співвідноситься з результатами морфогістологічних досліджень, у той час як у тварин з ожирінням, яким ізопротеренол не вводили, рівень BNP залишався незмінним, як порівняти із контролем; метформін достовірно

запобігає збільшенню концентрації BNP у плазмі крові щурів із ізопротеренол-індукованим ураженням міокарда;

- введення ізопротеренолу провокує масивне фіброзне ремоделювання міокарда у щурів, проте ожиріння сприяє ще інтенсивнішому розвитку цих процесів; лікування метформіном достовірно зменшує накопичення фіброзної тканини під впливом ізопротеренолу у міокарді щурів як з нормальною масою тіла, так і з ожирінням.

Результати, викладені у розділі 5, опубліковані в 1 статті [197].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Метою нашої роботи було дослідження кардіопротективних ефектів препарату метформін в умовах метаболічного стресу та гіпоксії. Для цього ми моделювали різні форми ураження серця, щоб відтворити патологічні процеси, які виникають в міокарді при ЦД, та аналізували ефективність препарату в цих умовах. Зокрема, експерименти проведені *in vitro* на культурі кардіоміобластів ембріонів щурів (H9C2 клітинах), які культивувалися в умовах нестачі кисню (1 % O₂) або в гіперглікемічному середовищі (додавання 2DG в 0 % медіум у кінцевій концентрації 2 ммоль/л), та *in vivo* при ішемічно-реперфузійному та ізопротеренол-індукованому (в умовах ожиріння чи без нього) ураженні міокарда.

Дослідження проведені із використанням сучасних методик. Морфометричні, біохімічні, гістологічні, імунофлюоресцентні, імуногістохімічні, імуноферментні методи, а також (ЗТ-ПЛР) в режимі реального часу та трансфекція генів здійснені для визначення досліджуваних показників.

На сьогодні існує велика база даних клінічних та експериментальних досліджень, яка свідчить про те, що ЦД є незалежним фактором виникнення ураження міокарда [159], а СН посідає перше місце серед причин смертності у діабетиків [198].

ЦД асоційований із найвагомішими факторами ризику СН, включаючи ожиріння, гіперліпідемію, гіперхолестеринемію, тромбоз, інфаркт, гіпертензію, активацію гормональної та цитокінової систем, автономну нейропатію, ендотеліальну дисфункцію та ішемічну хворобу серця [159]. Як результат, діабетики мають значно гірший прогноз щодо наслідків СН, ніж пацієнти без діабету [144].

Метформін, препарат першої лінії для стартової фармакотерапії ЦД 2 типу, має високий профіль безпеки та може зменшувати ризик виникнення

кардіоваскулярних ускладнень і зумовленої ними смертності [37]. Позитивний ефект препарату на діяльність серця зумовлений прямим впливом на клітинний метаболізм, ендотеліальну функцію, активність тромбоцитів та гомеостаз кальцію [199]. Встановлено, що метформін модулює фактори ризику для атеросклерозу, підвищує толерантність міокарда до ішемії-реперфузії та попереджує розвиток СН [159].

Проте детального вивчення потребують механізми та молекулярні мішені, які залучені у реалізацію кардіопротективних ефектів метформіну.

В першій серії дослідів нами з'ясовано властивості метформіну на H9C2 клітинах. Відомо, що кардіоміоцити ембріонів щурів імітують широкий спектр гіпертрофічних ознак, які виникають у лівому шлуночку у відповідь на стрес, і мають великі перспективи для аналізу *in vitro* [156].

В результаті проведених експериментів встановлено, що введення метформіну у живильне середовище H9C2 клітин сприяє зменшенню їх гіпертрофії та програмованої загибелі, зумовлених метаболічним стресом та гіпоксією.

Мальадаптивна гіпертрофія є однією із найпоширеніших ознак діабетичної кардіоміопатії [4], яка врешті призводить до СН із дилатацією шлуночка, та характеризується прогресуючим зниженням серцевого викиду, що зумовлює виникнення кардіальної дисфункції та злоякісних аритмій.

Раніше було встановлено, що метформін ефективно зменшує гіпертрофію, викликану поперечним звуженням аорти [200] та ін'єкціями ізопротеренолу [146]. Інша група дослідників [147] у своєму *in vitro* дослідженні також виявила, що метформін у низькій дозі (5 ммоль/л) захищає H9C2 клітини від ушкодження, викликаного гіпоксією та гіперглікемією.

Отримані нами дані, які свідчать про здатність метформіну запобігати гіпертрофії H9C2 клітин, зумовленій їх інкубацією в умовах експозиції із 2DG або обмеженого доступу кисню, підтверджують результати інших авторів та доводять, що препарат має великий потенціал у попередженні виникнення

серцево-судинних ускладнень, зумовлених гіпоксією та метаболічними порушеннями.

Кардіоміоцити, що піддаються стресу, мають порушений баланс між процесами виживання та загибелі [178], тому гіпертрофовані клітини врешті самознищуються шляхом апоптозу [77]. Такий тип загибелі клітин є потенційно патофізіологічним у механізмі трансформації гіпертрофії кардіоміоцитів як адаптивного явища при СН [85].

Для того, щоб встановити, чи впливає метформін на апоптичну відповідь Н9С2 клітин при метаболічному та гіпоксичному стресі, ми порівнювали відсоток загиблих кардіоміобластів у групах, які піддавалися дії коригуючого чинника, із тими, що залишалися нелікованими в умовах стресу. В результаті проведених експериментів нами доведено, що препарат достовірно запобігає апоптозу кардіоміобластів. Вважаємо, що здатність метформіну попереджувати втрату клітин міокарда є надзвичайно важливим фармакологічним ефектом, який зменшує прогресування СН.

АМФК є основним медіатором у реалізації фармакологічних ефектів метформіну [49]. Утім, на сьогодні все більш очевидним стає той факт, що цей фермент – далеко не єдина мішень у механізмі дії метформіну, і препарат може проявляти свою дію незалежно від його активності. Зокрема, групою науковців з'ясовано, що блокування гена АМФК α 2 у мишей не вплинуло на здатність метформіну проявляти кардіопротекцію [16].

Сімейство протеїнів FoxO, контролюючи експресію генів, що беруть участь у зупинці клітинного циклу, апоптозі, пошкодженні та відновленні ДНК, клітинному метаболізмі, залучене у різноманітні фізіологічні та патофізіологічні функції. У раніше проведених дослідженнях було встановлено, що метформін регулює активність FoxO1 в різних органах [149,150], проте немає даних щодо впливу препарату на експресію цих генів та білків у серці.

Тому за допомогою методу трансфекції ми дослідили, чи залежить ефективність метформіну в Н9С2 клітинах, зокрема, його антигіпертрофічні та антиапоптичні ефекти, від активності гена FoxO1.

Отримані результати демонструють, що метформін інгібує стрес-активовану апоптичну загибель клітин через FoxO1-залежний механізм. Встановлено, що при нормальній функції гена FoxO1 препарат ефективно запобігає програмованій загибелі H9C2 клітин, однак, у випадку їх трансфекції за допомогою siРНК FoxO1 здатність попереджувати програмовану загибель кардіоміобластів, індуковану гіпоксією-реоксигенацією, втрачається.

Аналогічну процедуру проведено з метою дослідження механізму, через який метформін реалізує антигіпертрофічну дію. Інгібування експресії гена FoxO1 призводить до втрати препаратом здатності запобігати збільшенню площі кардіоміобластів під впливом гіпоксії-реоксигенації. Проте ми не можемо стверджувати, що це відбулося через FoxO1-залежний механізм, адже блокування гена FoxO1 призвело до гіпертрофії H9C2 клітин абсолютно в усіх групах клітин, навіть тих, що культивувалися в умовах нормоксії. Це вказує на те, що виключення експресії FoxO1 провокує збільшення площі клітин, тобто, нормальне функціонування гена є обов'язковою умовою для підтримки фізіологічних розмірів кардіоміобластів. Раніше іншою групою дослідників [201] було встановлено, що експресія FoxO1 у кардіоміоцитах інгібує їх гіпертрофію.

В результаті проведення серії експериментів на культурі кардіоміобластів ембріонів щурів ми дійшли висновку, що метформін проявляє виражені антигіпертрофічні та антиапоптичні властивості в умовах як метаболічного стресу, так і гіпоксії. При індукованому гіпоксією-реоксигенацією ураженні H9C2 клітин метформін запобігає їх програмованій загибелі через FoxO1-залежний механізм. Однак, значення функції гена FoxO1 у механізмі антигіпертрофічної дії метформіну встановити не вдалося, тому це питання вимагає подальшого вивчення.

Наступна серія експериментів присвячена кардіопротективним ефектам метформіну при ураженні серця внаслідок ішемії-реперфузії у мишей дикого типу C57BL/6. Щоб оцінити трансляційний потенціал препарату, лікування у

дозі 5 мг/кг розпочинали через 15 хв після старту реперфузії та проводили упродовж 14 днів.

ІМ у пацієнтів із ЦД виникає частіше, ніж у популяції, та характеризується більш несприятливим прогнозом. Одним із основних наслідків ІМ є недостатність лівого шлуночка, який піддається гіпертрофічному та фіброзному ремоделюванню [202]. Крім того, неабияку роль у прогресуванні шлуночкового ремоделювання та СН відіграє стрес-індукована реактивація фетальних генів у пошкодженому міокарді [79]. Тому пошук лікарського засобу, який би запобігав кардіальному ремоделюванню після інфаркту міокарда, є актуальним завданням сучасної фармакології.

У раніше проведених дослідженнях було встановлено, що при моделюванні ІМ у мишей введення метформіну безпосередньо перед ішемією або в період реперфузії сприяло значному зменшенню зони інфаркту [141,203]. Важливо, що кардіопротективні ефекти метформіну при ішемії-реперфузії продемонстровані як на моделях тварин з діабетом [204], так і без нього [139,205,206].

Отримані нами результати свідчать про те, що тривале (14 днів) лікування метформіном після серцевої ішемії-реперфузії у мишей без метаболічних порушень не тільки запобігає кардіальному ремоделюванню, а й репрограмує експресію фетальних генів, які піддаються дисрегуляції внаслідок цих патологічних змін в міокарді.

Нам вдалося встановити, що введення метформіну запобігає індукованому ішемією-реперфузією надмірному росту кардіоміоцитів мишей. Антигіпертрофічний ефект перпарату підтверджений його здатністю запобігати ап-регуляції BNP гена, яка виникла при ураженні міокарда мишей і є ознакою гіпертрофії.

Як відомо, BNP служить біомаркером для скринінгу субклінічної діастолічної дисфункції шлуночка у пацієнтів із неконтрольованим діабетом [207,208]. Тому як зменшення площ кардіоміоцитів, так і пригнічення експресії мРНК BNP при лікуванні метформіном після ішемії-реперфузії

свідчить про вагомий потенціал препарату у профілактиці розвитку шлуночкової дисфункції та СН.

Іншим важливим показником серцевої діяльності є функція генів α - та β -МНС. Так, при гіпертрофії міокарда різко підвищується експресія β -МНС гена, коли експресія гена α -МНС, яка в нормі є домінуючою, пригнічується [177].

Достовірного впливу метформіну на експресію генів α - і β -МНС у нашому дослідженні не встановлено, що відрізняється від результатів, описаних іншими науковцями. Раніше було виявлено, що препарат інгібує збільшення рівнів мРНК β -МНС, надмірна експресія якої виникає при ураженні серця, зумовленому підвищеним тиском або доксорубіцином, проте дози метформіну в обох дослідженнях були значно вищими [200,209].

Доросле серце складається із повністю диференційованих кардіоміоцитів, що відповідають за скорочувальну функцію, яка порушується при СН як наслідок надмірної смерті клітин. Обмежена здатність міокарду ефективно регенерувати підкреслює важливість збереження його структурних компонентів для підтримки фізіологічної діяльності. Серцево-судинний гомеостаз залежить від балансу між смертю клітин та їх виживанням, тому надмірна програмована загибель кардіоміоцитів залучена у патогенез багатьох кардіоваскулярних захворювань [210].

В нещодавньому дослідженні було встановлено, що метформін пригнічує апоптоз при цисплатин-індукованому гострому ураженні нирок [211], що свідчить про антиапоптичний потенціал метформіну в периферичних органах. Тому є потреба у дослідженні потенційних механізмів дії та біологічних ефектів лікарського засобу при метаболічних та неметаболічних порушеннях.

Результати нашої роботи демонструють здатність метформіну інгібувати апоптоз у міокарді мишей після ішемії-реперфузії. Можливість попереджувати втрату клітин серця свідчить про великий потенціал препарату у запобіганні виникненню та прогресуванню СН.

У наступній серії експериментів ми з'ясували, який вплив має метформін на експресію генів, що залучені у регуляцію процесів апоптозу, зокрема, на

Bcl2, Caspase та Bax. Відомо, що Bcl2 є антиапоптичним геном, у той час як про-апоптичний Bax дестабілізує мітохондріальні мембрани, що веде до вивільнення цитохрому c з наступною активацією каспази-9 шляхом утворення цитозольного комплексу, який, врешті, активує каспазу-3 [85], ап-регуляція якої пов'язана із апоптозом та СН у експериментальних тварин та людей [212]. Отримані дані підтверджують, що надмірна програмована загибель кардіоміоцитів супроводжується ап-регуляцією Bax та каспази 3, у той час як функція Bcl2 пригнічується.

Раніше групою авторів [213] було встановлено, що метформін регулює процеси апоптозу у ізольованих кардіоміоцитах як через каспаза 3-залежний шлях, так і незалежно від нього. У нашій роботі при лікуванні мишей метформіном відмічається чітка тенденція до зменшення експресії мРНК каспази 3, проте такі зміни не є достовірними, що може бути пов'язано із відносно невеликою кількістю мишей в експерименті. Тому пошук зв'язку між антиапоптичним ефектом метформіну у міокарді, ураженому ішемією-реперфузією, та його впливом на каспазу 3 вимагає детальнішого вивчення.

У дослідженні команди науковців [214] встановлено, що метформін дозозалежно посилює експресію антиапоптичного внутрішньоклітинного білкового фактора Bcl2 у гепатоцитах. В іншій роботі описано, що метформін захищає фібробласти шкіри людини від апоптозу, зменшуючи експресію протеїнів Bax та підвищуючи Bcl2, що веде до зростання співвідношення Bcl-2/Bax [215].

Отримані нами результати свідчать, що введення метформіну не спричиняє достовірних змін експресії генів Bax та Bcl2 у міокарді мишей, ушкодженому ішемією-реперфузією. Це може бути пов'язано із тим, що метформін попереджає апоптоз, впливаючи на експресію інших генів, залучених у процес запрограмованої загибелі кардіоміоцитів. Отже, актуальним залишається питання пошуку генів, які відповідають за реалізацію апоптичної відповіді.

Раптова смерть кардіоміоцитів в зоні інфаркту веде до активації інтенсивної, але транзитної, запальної відповіді, яка сприяє очищенню рани від загиблих клітин та залишків матриксу. Водночас пролонгована активація пост-інфарктного запалення збільшує протеазну активність та асоціюється із надмірним ремоделюванням [216], тому його вчасне пригнічення може попередити виникнення СН [106]. Відомо, що попереднє лікування метформіном зменшує запалення після ІМ у щурів [108,217].

Інфільтрація макрофагами є одним із перших компонентів запальної реакції, що сприяють активації фібробластів та ендотеліальних клітин, необхідних для формування рубця та ангіогенезу [103]. Виявлено, що у пацієнтів із порушеною толерантністю до глюкози метформін не зменшував експресію CD68 глікопротеїна, який виділяється макрофагами і є їх маркером [218].

Нами було встановлено, що як експресія глікопротеїна CD68 макрофагами, так і активність одноіменного гена, є достовірно вищими після ішемії-реперфузії, а лікування метформіном запобігає цим змінам. Це свідчить про протизапальний потенціал препарату.

Ще однією ознакою запальної відповіді після ішемії-реперфузії у тканинах є індукція хемокінів [105]. При невеликій площі інфаркту априорно регульовані цитокіни повертаються до норми упродовж 24 год, проте при масивному ураженні міокарда виникає вторинна хвиля гіперекспресії, що відповідає хронічній фазі ремоделювання, залучаючи у процес увесь серцевий м'яз [105].

Ап-регуляція фактора некрозу пухлин- α та інтерлейкіна-6 є природньою стресовою відповіддю на пошкодження міокарда [105]. Відомо також, що надмірна експресія TNF- α та IL-6 стимулює продукцію моноцитарного хемоаттрактного протеїна-1 (MCP-1), який мобілізує моноцити у процес репарації міокарда після інфаркту, а рівень експресії його мРНК в ішемізованому міокарді корелює із накопиченням лейкоцитів [219]. Проте достеменно невідомо, яке значення має таке репрограмування. Зокрема,

надмірну експресію TNF- α [95] та IL-6 [220] пов'язують із пригніченням скоротливої функції серця, посиленням апоптозом, стимуляцією росту кардіоміоцитів, у той час як в інших дослідженнях встановлено, що дані цитокіни чинять протективну роль [221] або не залучені у процеси ремоделювання [220]. Враховуючи значну кількість результатів досліджень, які є часто суперечливими і свідчать як про позитивні, так і негативні ефекти цитокінів у міокарді після інфаркту, можна говорити про їх складний, плейотропний вплив на біологічні процеси [95]. Тому медикаментозний вплив на експресію TNF- α , IL-6 та MCP-1 може мати непередбачувані наслідки.

У наших дослідженнях вставлено, що ішемія-реперфузія провокує ап-регуляцію TNF- α , MCP-1 та IL-6, проте терапія метформіном не зменшує рівні експресії їх мРНК. Враховуючи вищесказане, відсутність втручання метформіну у процеси регуляції генів цитокінів можна розглядати як позитивний ефект, що не порушує природні механізми загоєння у ділянці некрозу.

Замісний фіброз, який виникає в ділянці некрозу як адаптивне явище, поширюється згодом на неінфарктну зону, що є прикладом реактивного фіброзу, який характеризується заповненням міжм'язових просторів колагеновими волокнами та посиленням периваскулярним фіброзом навколо більшості коронарних артерій [1]. Надмірне депонування колагену, зумовлене порушенням балансом між його синтезом та деградацією [179], врешті, спричиняє надмірну жорсткість міокарда та є причиною аритмогенності [95].

Міофібробласти відіграють вирішальну роль у репаративній відповіді та формуванні рубця [179], а їх ключовою ознакою є інкорпорація альфа-актину гладких м'язів (α -SMA), що характеризується високою аритмогенністю [108].

В результаті проведених досліджень нам вдалося встановити, що у мишей типу C57BL/6 метформін зменшує індуковане ішемією-реперфузією

розростання фіброзних волокон у міокарді та попереджує ап-регуляцію гена α -SMA, що свідчить про анти-аритмогенну здатність препарату та його потенціал щодо запобігання виникненню злякисного ремоделювання.

Кардіоспецифічна гіперекспресія TGF- β_1 спричиняє гіпертрофію та фіброз у міокарді, регулюючи депозицію матриксних протеїнів і посилюючи експресію α -SMA у фібробластах [222]. Надмірне утворення фіброзної тканини і синтез позаклітинного матриксу виникає за рахунок підвищеної продукції і кумуляції колагену типів I та III [5] у адвентиції коронарних артерій, а згодом і в інтерстиційному просторі [222].

Ап-регуляція гена COL3A1 різко зростає на ранніх стадіях (2 день після ІМ), оскільки проколаген типу III служить опорою для депозиції колагенових фібрил типу I, та утримується щонайменше 21 день. Ап-регуляція гена COL1A1 спостерігається дещо пізніше (4 день). Підвищений рівень мРНК проколагену типу I у інфарктній зоні утримуються близько 90 днів [223].

Дані наших експериментів демонструють достовірне зниження мРНК COL3A1 при застосуванні метформіну порівняно із нелікованими після ішемії-реперфузії мишами, що свідчить про знижену продукцію колагену III типу у міокарді. Однак, вірогідних змін функцій генів COL1A1 та TGF- β_1 під впливом метформіну не виявлено. Такі результати можуть бути зумовлені тим, що рівні експресії генів варіюють залежно від часу, який минає після ІМ.

Раніше група дослідників [224] виявила, що метформін зменшує фіброз, інгібуючи надмірну експресію генів COL1A1 та TGF- β_1 , зумовлену інфарктом міокарда у мишей, проте доза препарату була значно вищою і курс лікування тривалішим, ніж у нашому експерименті. Такі ж ефекти препарату виявлено на культурі серцевих фібробластів дорослих мишей, проте ефект був дозозалежним. Тому, можливо, у більшій дозі метформін міг би проявити активність відносно генів COL1A1 та TGF- β_1 .

Таким чином, нами було досліджено, що у мишей типу C57BL/6 лікування метформіном упродовж 14 днів після ішемії-реперфузії у дозі 5 мг/кг ефективно запобігає кардіальному ремоделюванню. Зокрема, препарат попереджує

гіпертрофію і програмовану загибель кардіоміоцитів та ап-регуляцію прогіпертрофічного BNP гена, зменшує запалення в зоні інфаркту шляхом даун-регуляції гена та глікопротеїна CD68, інгібує синтез фіброзної тканини завдяки пригніченню експресії прогіпертрофічних генів, відповідальних за продукцію гладком'язового актину α та колагену III типу.

Наступна частина експериментів присвячена вивченню кардіопротективних властивостей метформіну при ізопротеренол-індукованому ураженні міокарда у щурів із нормальною масою тіла або ожирінням.

За останні десятиліття ожиріння набуло статусу епідемії як серед дорослого населення, так і серед дітей [225]. Це є результатом надмірного споживання цукру та насичених жирів, які активують прозапальні сигнальні шляхи, що асоціюється із підвищеним ризиком виникнення численних коморбідних станів, зокрема, ЦД 2 типу, дисліпідемії, певних видів раку та серцево-судинних захворювань [226].

Ожиріння чинить прямий негативний вплив на серцеву морфологію та систолічну і діастолічну функції ЛШ [227], оскільки воно супроводжується збільшенням загального об'єму крові та серцевого викиду, які чинять надмірне навантаження на серце, що, врешті, призводить до дилатації ЛШ із наступною гіпертрофічною відповіддю на клітинному та органному рівнях. Ще однією важливою причиною підвищеного серцевого викиду є надмірна симпатична активність, що супроводжується тахікардією [225].

Зменшення маси тіла шляхом підвищення фізичної активності та обмеження споживання цукру і насичених жирів вважається оптимальною терапевтичною стратегією у пацієнтів з ожирінням та супутніми коморбідними станами, зокрема, при ЦД 2 типу, оскільки схуднення асоціюється із покращеним контролем рівня глюкози та зниженням серцево-судинних ризиків [226]. Зменшення маси тіла є потужним предиктором у запобіганні ЦД 2 типу [33].

Відомо, що метформін покращує чутливість рецепторів до інсуліну та зменшує інсулінорезистентність, яка є провідною патофізіологічною

ланкою розвитку ЦД 2 типу [228]. Як наслідок, знижується маса тіла, гіперінсулінемія та гіперглікемія [15,229] та сповільнюється трансформація порушеної толерантності до глюкози у діабет або попереджується його розвиток [135].

Результати Diabetes Prevention Program свідчать про здатність препарату достовірно зменшувати прояви ожиріння [33], у той час як в інших дослідженнях цей ефект не був підтверджений [136,137]. Така різниця у результатах може бути пов'язана із дозуванням метформіну, тривалістю його прийому та калорійністю раціону [230].

Моделі індукованого дієтою ожиріння у гризунів широко використовуються в експериментальній медицині для вивчення механізмів ожиріння у людей та потенційних підходів у його лікуванні. Зокрема, у щурів породи Вістар в результаті застосування дієти із підвищеним вмістом жирів швидко розвивається ожиріння, що супроводжується метаболічними порушеннями. Найбільш ефективно застосування такої дієти у молодих тварин упродовж тривалого часу: збільшення маси тіла проявляється вже через 2 тижні, проте індукований дієтою фенотип розвивається через 4 тижні [231].

Дієта вважається високожировою, коли від 32 до 60 % калорій надходить у вигляді жиру. Використовуючи дієту із нижчим відсотком жиру (45 %) ожиріння розвивається повільніше, що відтворює збільшення маси тіла у людей. Така модель є також зручнішою для вивчення впливу лікарських засобів на ожиріння, оскільки дуже високий вміст жирів (60 %) чинить незворотні зміни на метаболізм, що неможливо стримати або реверсувати за допомогою препаратів [232].

Щоб змодельювати ожиріння у щурів ми використовували високожирову дієту із вмістом жирів 45 % упродовж 35 днів. Через 28 днів від початку дієти маса тіла щурів була достовірно збільшена, і ми розпочали лікування метформіном у дозі 100 мг/кг, яке тривало 7 днів в умовах надмірного споживання жирів. В результаті було встановлено, що метформін запобігає

подальшому збільшенню маси тіла у щурів, хоча достовірного її зниження не виявлено, що ми пов'язуємо із короткою тривалістю лікування.

Враховуючи, що пацієнти із ЦД 2 типу застосують метформін тривало, на нашу думку, його потенціал у зниженні маси тіла відіграє важливу роль у реалізації кардіопротекції.

Відомо, що гіпертригліцеридемія є найбільш поширеним розладом ліпідного спектру крові при ЦД 2 типу [233] та незалежним предиктором розвитку серцево-судинної патології [234], тому підтримання нормального рівня триацилгліцеролу крові є потенційною мішенню для профілактики цих порушень [235].

В нашому дослідженні встановлено, що надмірний вміст ліпідів у дієті щурів зумовив, окрім гіпертригліцеридемії, гіперхолестеринемію та підвищену концентрацію ЛПНЩ, проте лікування метформіном призвело до достовірного зниження лише рівня триацилгліцеролу у сироватці крові.

Ми вважаємо це дуже важливим моментом, адже в пацієнтів із інсулінорезистентністю і ЦД 2 типу високий рівень триацилгліцеролу та жирних кислот є одним із найбільш частих розладів ліпідного спектру крові, що, за даними авторів [236], пов'язано із надмірним ліполізом у жировій тканині та печінковою гіперпродукцією жирів.

За таких умов збільшується надходження жирних кислот та триацилгліцеролу до кардіоміоцитів, які швидко адаптуються до цього стану шляхом їх посиленої утилізації. Проте, коли оксидативна здатність клітин вичерпується, вони накопичуються у різних тканинах, зокрема, у міокарді, та спричиняють ліпотоксичність [237]. При цьому зростає потреба міокарду в кисні, посилюється продукція реактивних форм кисню, зменшується синтез АТФ, збільшується мітохондріальна дисфункція та запускається апоптоз. Разом ці патофізіологічні процеси відіграють важливу роль у розвитку діабет-асоційованого ураження серця [161].

Нами було встановлено, що у групі щурів, які отримували високожирову дієту, площі кардіоміоцитів були достовірно збільшені, у порівнянні із

тваринами, які отримували нормальну дієту. Отже, ми підтвердили факт, що тривале споживання їжі, збагаченої жирами, насправді призводить до негативного впливу ліпідів на серце.

Гіпертрофія у щурів, що отримували високожирову дієту, на наш погляд, може розглядатися як перший етап у сукупності адаптивних відповідей серця на стрес, викликаний великою кількістю фізіологічних та патологічних стимулів.

Механізми, залучені у виникнення серцевої гіпертрофії в цьому випадку, пов'язують як із порушенням сигнальних реакцій інсуліну [238], так і з перманентною активацією протеїнкінази С метаболітами тригліцеридів [239].

У нашому дослідженні введення метформіну не запобігало гіпертрофії кардіоміоцитів щурів, що отримували високожирову дієту.

Окрім ожиріння, ми також змоделювали ураження міокарда шляхом інтраперитонеального введення ізопротеренолу у дозі 5 мг/кг упродовж 7 днів, що дозволило відтворити модель ураження серця, що виникає при гіперреактивності адренергічної нервової системи у пацієнтів.

З цією метою ми вводили щурам ізопротеренол, адреноміметик, який діє виключно на β -адренорецептори, проявляючи виражену кардіостимулюючу дію: препарат збільшує частоту та силу серцевих скорочень, що призводить до підвищеного серцевого викиду. Проте, у зв'язку із стимуляцією β_2 -адренорецепторів артеріол скелетних м'язів, ізопротеренол викликає зменшення периферичного опору та призводить до зниження середнього артеріального та діастолічного тиску крові [193].

Під впливом ізопротеренолу виникає підвищена потреба міокарду в кисні, проте надходження крові обмежене через гіпотензією у коронарному руслі. Крім того, всередині клітини відбувається накопичення іонів кальцію, що веде до активації аденілатциклази та зниження рівня АТФ. Все це чинить вкрай негативний вплив на серце, тому препарат використовується у експериментальній медицині для моделювання кардіальної патології [193].

Існує 3 схеми застосування ізопротеренолу з метою моделювання кардіальної патології. У вищих дозах, що вводяться одноразово або двічі, виникає інфаркт, а у низьких дозах (від 0.3 до 6 мг/кг) при тривалому введенні (1-3 тижні) препарат викликає гіпертрофію міокарда із подальшим некрозом та фіброзом тканини, що характерно для хронічної адренергічної гіперактивності. Індуковане ізопротеренолом ураження серця у експериментальних тварин характеризується тими ж метаболічними та морфологічними змінами тканин, що і в людей. Тривале введення ізопротеренолу у щурів сприяє зміні типової експресії кардіальних генів [193].

Адренергічні нейротрансмітери симпатичної нервової системи відіграють важливу роль у регуляції фізіологічних функцій серця, проте пролонгована та надмірна активація адренорецепторів призводить до кардіальної дисфункції та загибелі клітин [240], а також є важливим чинником у патогенезі патологічної кардіальної гіпертрофії [241]. Симпатичний гіпертонус вважається центральною патофізіологічною ознакою у пацієнтів із СН, а підвищення рівня норадреналіну плазми крові корелює із ступенем дисфункції лівого шлуночка [192].

У пацієнтів із ЦД надмірна активність симпатичної нервової системи є одним із перших та основних проявів кардіальної автономної нейропатії, яка часто виникає як важке діабетичне ускладнення [11].

Відомо, що тривала активація β -адренорецепторів є потужним патологічним стимулом, що опосередковується продукцією аденілатциклази та циклічного аденозинмонофосфату. При цьому виникає гіпертрофічний фенотип, що включає надмірний синтез протеїнів, експресію протоонкогенів, посилений оксидативний стрес, запалення та стимуляцію мітоген-активованої протеїнкінази [242]. До того ж, стимуляція β -адренорецепторів служить запуском експресії фетальних генів [242], зокрема, мозкового натрійуретичного пептиду [194].

Експресія гена BNP зростає при розвитку СН, а підвищений рівень циркулюючого у плазмі BNP є маркером дисфункції лівого шлуночка [194] та

асоціюється із підвищеним ризиком смертності у пацієнтів із кардіоваскулярними патологіями [243]. Експресія BNP гена є значно підвищеною у тварин із гіперінсулінемією та інсулінорезистентністю [207].

В результаті проведених гістологічних досліджень було встановлено, що введення ізопротеренолу у дозі 5 мг/кг упродовж 7 днів викликає гіпертрофічні зміни міокарда. Ці дані підтверджені імуноферментним аналізом концентрації BNP у сироватці крові, яка була достовірно збільшена у щурів з гіпертрофією.

При цьому у щурів із нормально масою тіла площі кардіоміоцитів були збільшені вдвічі, у той час як у тварин, що отримували високожирову дієту під час моделювання кардіоміопатії, клітини міокарда мали втричі більші розміри, що вкотре підтверджує негативний вплив ожиріння та надмірного споживання жирної їжі на серце.

Лікування метформіном у дозі 100 мг/кг істотно зменшує гіпертрофічну відповідь міокарда при моделюванні ізопротеренолової кардіоміопатії у щурів як із нормальною масою тіла, так і з ожирінням, що супроводжувалося достовірно нижчою концентрацією сироваткового BNP.

Незважаючи на це, розміри кардіоміоцитів у щурів із ожирінням та ізопротереноловою кардіоміопатією при лікуванні метформіном все ж були збільшені, у порівнянні із контролем, тобто, незначна гіпертрофія таки виникала, хоча вона була достовірно менша, ніж у групі нелікованих тварин, та не супроводжувалася гіперекспресією BNP. Це відображає результати, які ми отримали від щурів, що отримували високожирову дієту без введення ізопротеренолу: гіпертрофія виникала, проте вона була значно меншою, ніж при індукуванні ізопротеренолової кардіоміопатії, і рівень сироваткового BNP не зазнавав достовірного підвищення.

Все це можна пояснити тим, що високожирова дієта розпочалася задовго до введення метформіну, тому деякі гіпертрофічні зміни відбулися ще до початку лікування. Отже, препарат потрібно застосовувати якомога раніше, щоб попередити негативний вплив ожиріння на організм.

Введення ізопротеренолу у щурів асоціюється також із дифузним фіброзом міокарда в умовах інтактної коронарної васкуляризації [196]. Це пов'язано із тим, що під впливом ізопротеренолу внаслідок порушеного балансу між потребою в кисні та його надходженням, а також надмірної внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, виникає некроз кардіоміцитів із наступним відновленням тканини у вигляді фіброзу. Проте погіршення рівноваги між синтезом та деградацією протеїнів позаклітинного матриксу сприяє надмірному накопиченню фібрилярного колагену, що посилює жорсткість шлуночків та погіршує процеси скорочення і релаксації, електричну взаємодію між кардіоміоцитами та серцеву функцію в цілому [244].

Кардіальний фіброз є основним фактором прогресії СН, а його профілактика є потенційною терапевтичною мішенню [196].

В результаті моделювання кардіоміопатії нами було виявлено, що введення ізопротеренолу викликало депонування фіброзної тканини у міокарді щурів, при чому ожиріння сприяло її посиленому накопиченню. Лікування метформіном попередило фібротичне ремоделювання серцевого м'яза як у щурів з нормальною масою тіла, так і з ожирінням.

Отже, результати проведених нами досліджень свідчать, що протидіабетичний препарат метформін проявляє виражені кардіопротективні ефекти на кардіоміобласти ембріонів щурів (H9C2 клітини) в умовах метаболічного стресу, гіпоксії та гіпоксії-реоксигенації, проявляючи антигіпертрофічну та антиапоптичну дію; на міокард мишей типу C57Bl/6J в умовах ішемії-реперфузії, захищаючи його від гіпертрофічного, апоптичного, фібротичного ремоделювання та запалення; на кардіоміоцити щурів породи Вістар з нормальною масою тіла або ожирінням із змодельованою ізопротереноловою кардіоміопатією, запобігаючи ліпотоксичності, гіпертрофії та фіброзу. Молекулярні мішені метформіну, які залучені у реалізацію цих ефектів або не беруть участі в них, наведені на рисунку 6.1.

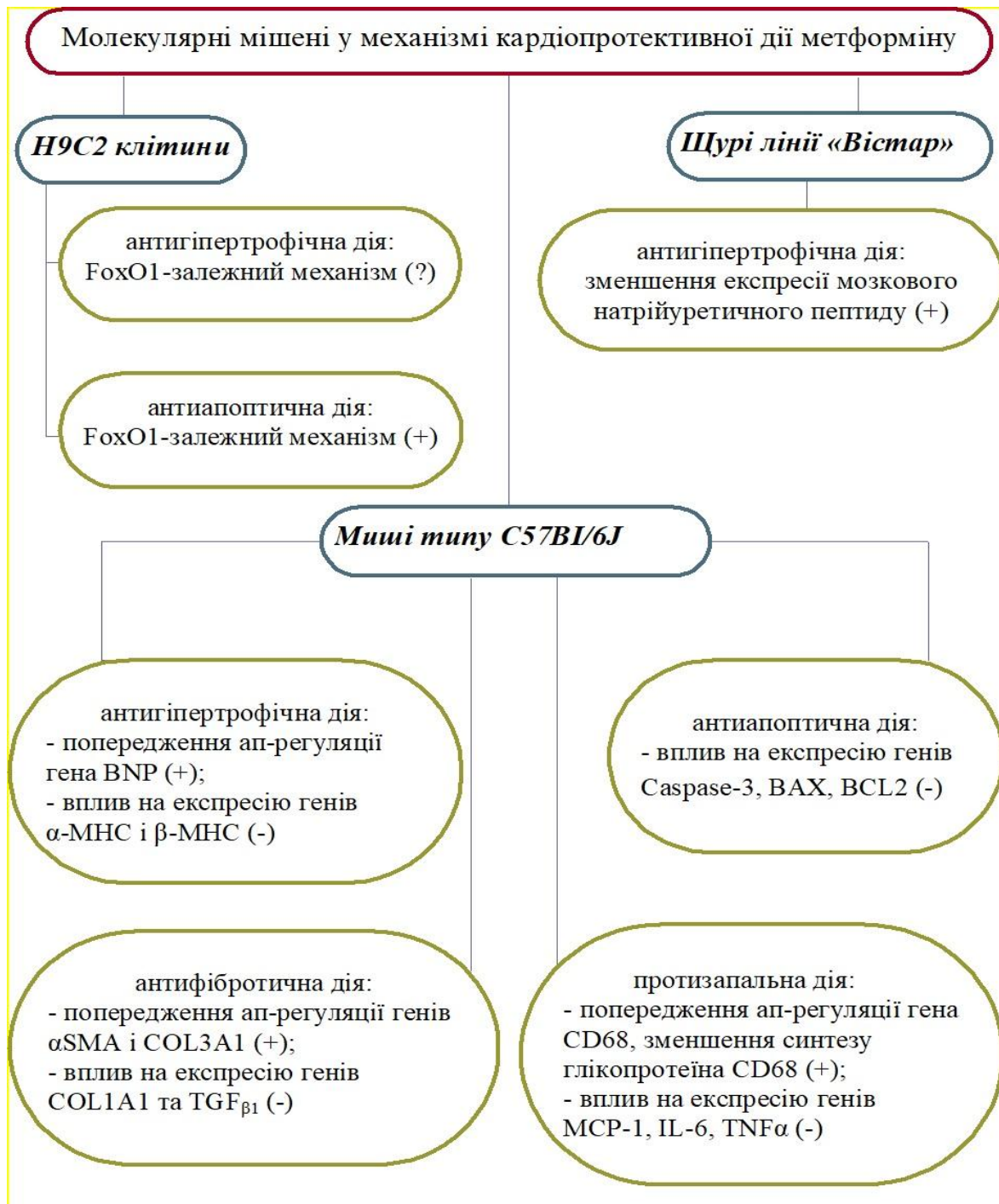


Рисунок 6.1 – Молекулярні мішені у механізмі кардіопротективної дії метформіну

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота присвячена вирішенню актуального наукового завдання – встановленню механізмів кардіопротективних ефектів метформіну на основних моделях ураження серця при цукровому діабеті. Отримані результати дозволяють обґрунтувати молекулярні і біохімічні механізми реалізації деяких фармакодинамічних властивостей препарату та підтверджують доцільність його використання як лікарського засобу, що попереджує розвиток та зменшує прояви основних форм ураження міокарда при цукровому діабеті.

1. In vitro метформін достовірно запобігає гіпертрофії кардіоміобластів, зумовленій стресом. В умовах метаболічного стресу та гіпоксії спостерігається збільшення площ Н9С2 клітин у 1,9 та 2,2 рази відповідно, проте лікування препаратом ефективно попереджає гіпертрофічну відповідь клітин.

2. Метформін захищає Н9С2 клітини від запрограмованої загибелі, індукованої стресом. За умов метаболічного стресу або гіпоксії кількість апоптичних клітин різко зростає (у 8 та 5,5 разів відповідно). Метформін запобігає активації процесів запрограмованої загибелі як при метаболічному стресі, так і гіпоксії.

3. Трансфекція гена FoxO1 викликає гіпертрофію кардіоміобластів у всіх групах, зокрема, тих, що інкубуються в умовах нормоксії: площа Н9С2 клітин із пригніченою функцією гена FoxO1 – $(2543 \pm 48,82)$ мкм² проти $(1504 \pm 20,90)$ мкм² у групі контролю, $p < 0,001$. Така гіпертрофічна відповідь на трансфекцію свідчить про те, що нормальне функціонування гена FoxO1 є обов'язковою умовою для підтримки фізіологічних розмірів Н9С2 клітин.

4. Анти-апоптичний ефект метформіну в Н9С2 клітинах реалізується через FoxO1-залежний механізм, оскільки трансфекція цього гена призводить до втрати препаратом можливості запобігати запрограмованій загибелі кардіоміобластів, зумовленій гіпоксією-реоксигенацією. При цьому інгібування функції гена не провокує апоптичну відповідь при нормоксії.

5. Метформін проявляє виражену протективну дію на міокард при його ураженні внаслідок ішемії-реперфузії у мишей. Препарат попереджає гіпертрофію та апоптоз кардіоміоцитів, чинить протизапальний ефект у зоні некрозу, зменшує пост-інфарктний фіброз і запобігає ап-регуляції прогіпертрофічного BNP, профібротичних α SMA та COL3A1 та прозапального CD68 генів.

6. При ожирінні у щурів, викликаному застосуванням дієти з високим вмістом жирів, метформін запобігає збільшенню маси тіла та сприяє достовірному зниженню рівня триацилгліцеролу, порівнюючи із нелікованими тваринами. При індукованій ізопротеренолом кардіоміопатії препарат достовірно запобігає гіпертрофії кардіоміоцитів, проте достовірного впливу на площу клітин у тварин з ожирінням, що не отримували ін'єкцій ізопротеренолу, не встановлено. Антигіпертрофічна дія метформіну підтверджена достовірно меншою концентрацією BNP у плазмі крові при ізопротеренол-індукованому ураженні міокарда у щурів з нормальною масою тіла та з ожирінням; метформін запобігає фіброзному ремоделюванню серцевого м'яза, зумовленому введенням ізопротеренолу, у тварин як з нормальною масою тіла, так і з ожирінням.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kharroubi AT. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes*. 2015;6(6):850–67.
2. Kalasz H, Singh J. Chronic Complications of Diabetes Mellitus: A Mini Review. *Courent Diabetes Rev*. 2017;13:3–10.
3. Pappachan JM, Varughese GI, Sriraman R, Arunagirinathan G. Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnostic evaluation and management. *World J Diabetes*. 2013;4(5):177–89.
4. Aneja A, Tang WH, Bansilal S, Garcia MJ, Farkouh ME. Diabetic Cardiomyopathy: Insights into Pathogenesis, Diagnostic Challenges, and Therapeutic Options. *Am J Med*. 2008;121(9):748–57.
5. Muralidaran Y, Viswanathan P. Diabetic Cardiomyopathy: A New Perspective of Mechanistic Approach. *J Diabetes Metab*. 2015;6(10):1–5.
6. Itoh T, Miki T, Miura T, Sunaga D. Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11(67):1–13.
7. Norhammar A, Lindbäck J, Rydén L, Wallentin L, Stenestrand U. Improved but still high short- and long-term mortality rates after myocardial infarction in patients with diabetes mellitus: A time-trend report from the Swedish Register of Information and Knowledge about Swedish Heart Intensive Care Admission. *Heart*. 2007;93(12):1577–83.
8. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357(23):1121-35.
9. Ding M, Lei J, Han H, Li W, Qu Y, Fu E, et al. SIRT1 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via activating eNOS in diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14(1):1–12.
10. Vinik AI, Casellini C, Parson HK, Colberg SR, Nevoret ML. Cardiac autonomic neuropathy in diabetes: A predictor of cardiometabolic events. *Front Neurosci*. 2018;12:1–11.

11. Balcioglu AS, Muederrisoğlu H. Diabetes and cardiac autonomic neuropathy: Clinical manifestations, cardiovascular consequences, diagnosis and treatment. *World J Diabetes*. 2015;6(1):80–91.
12. Брюхова ОВ, Маньковський БМ. Структурні зміни міокарда у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу та кардіальною автономною нейропатією. *Проблеми ендокринної патології*. 2018;1:16–21.
13. The Diabetes Prevention Program Research Group. The 10-year cost-effectiveness of lifestyle intervention or metformin for diabetes prevention: An intent-to-treat analysis of the DPP/DPPOS. *Diabetes Care*. 2012;35(4):723–30.
14. American Diabetes Association. Diabetes 2019 Guidelines. *Diabetes Care*. 2018;42(Suppl. 1):90–102.
15. UK Prospective Diabetes Study Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*. 1998;352:854–65.
16. Xu X, Lu Z, Fassett J, Zhang P, Hu X, Liu X, et al. Metformin protects against systolic overload-induced heart failure independent of AMP-activated protein kinase $\alpha 2$. *Hypertension*. 2014;63(4):723–8.
17. Gojka R. WHO Global report on diabetes: A summary. *Int J Non-Commun Dis*. 2016;1(1):3–8.
18. Паньків В.І. Цукровий діабет: визначення, класифікація, епідеміологія, фактори ризику. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2013;7(55):95–104.
19. Власенко МВ, Семенюк ІВ, Слободянюк ГГ. Цукровий діабет і ожиріння – епідемія ХХІ століття: сучасний підхід до проблеми. *Український терапевтичний журнал*. 2011;2:50–5.
20. Kahn BB, Flier JS, Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance Find the latest version : Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106(4):473–81.
21. Care D, Suppl SS. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes 2019. *Diabetes Care*. 2019;(Suppl. 1):13–28.

22. Stumvoll M, Goldstein BJ, Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005;365:1333–46.
23. McGarry JD. Dysregulation of Fatty Acid Metabolism in the Etiology of Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2002;51(1):7–18.
24. Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, Hawkins MA, Ling C, Mather KJ, et al. β -Cell failure in type 2 diabetes: Postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(6):1983–92.
25. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am*. 2004;88(4):787–835.
26. Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Luciano R. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med*. 2002;8:1376–82.
27. Gerich JE. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: Therapeutic implications. *Diabet Med*. 2010;27(2):136–42.
28. Abrahamson MJ. Should Sulfonylureas Remain an Acceptable First-Line Addition to Metformin Therapy in Patients With Type 2 Diabetes? Yes , They Continue to Serve Us Well ! *Diabetes Care*. 2015;38:166–9.
29. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A patient-centered approach. *Diabetes Care*. 2012;35(6):1364–79.
30. Маньковский Б. Терапия сахарного диабета 2 типа: нереализованные потребности и новые возможности. *Диабет Ожиріння Метаболічний синдром*. 2014;4:37–41.
31. Jenny-Avital ER. Intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;359(14):1519–21.
32. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): Prospective observational study. *Br Med J*. 2000;321:405–12.
33. Group The Diabetes Prevention Program Research. Long-term safety,

- tolerability, and weight loss associated with metformin in the diabetes prevention program outcomes study. *Diabetes Care*. 2012;35(4):731–7.
34. Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. Metformin pathways: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics*. 2012;22(11):820–7.
 35. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: From mechanisms of action to therapies. *Cell Metab*. 2014;20(6):953–66.
 36. Паньків В.І. Індивідуальний підхід до лікування цукрового діабету 2 типу: коли, кому і які альтернативні варіанти, окрім метформіну. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2013;8(56):36–9.
 37. Matthews DR, Neil H. 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2008;359:1577-89.
 38. Viollet B, Guigas B, Garcia NS, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci*. 2012;122(6):253–70.
 39. Pollak MN. Investigating metformin for cancer prevention and treatment: The end of the beginning. *Cancer Discov*. 2012;2(9):778–90.
 40. Kinaan M, Ding H, Triggle CR. Metformin: An Old Drug for the Treatment of Diabetes but a New Drug for the Protection of the Endothelium. *Med Princ Pract*. 2015;24(5):401–15.
 41. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*. 2011;50(2):81–98.
 42. Product Monograph : GLUCOPHAGE® [Internet]. Sanofi-aventis Canada Inc., 2018 [updated 2018 March 02]. Available from: <http://products.sanofi.ca/en/glucoophage.pdf>
 43. Lalau JD, Lacroix C. Measurement of metformin concentration in erythrocytes: clinical implications. *Diabetes, Obes Metab*. 2003;5(2):93–8.
 44. Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi SI, Baxter RC. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(3):1323–32.

45. Maida A, Lamont BJ, Cao X, Drucker DJ. Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice. *Diabetologia*. 2011;54(2):339–49.
46. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000;49(12):2063–9.
47. Mithieux G, Guignot L, Bordet J, Wiernsperger N. Intrahepatic mechanisms underlying the effect of metformin in decreasing basal glucose production in rats fed a high-fat diet. *Diabetes*. 2002;51:139–43.
48. Zhou G, Goodyear LJ, Moller DE, Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001;108(8):1167–74.
49. Путилин Д.А., Камышный А.М. Изменения уровня экспрессии генов Glut1, mTOR И AMPK1 α лимфоцитами панкреатических лимфатических узлов крыс при экспериментальном сахарном диабете. *Медицинская иммунология*. 2016;18(4):339–46.
50. Goodyear L. AMP-activated protein kinase: a critical signaling intermediary for exercise-stimulated glucose transport? *Exerc Sport Sci Rev*. 2000;28(3):113–6.
51. Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes*. 2000;49(6):896–903.
52. Foretz M, Carling D, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. AMP -activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 1998;273(24):14767–71.
53. Камишний ОМ, Путілін ДА, Сухомлінова ІЄ, Камишна ВА. Імунометаболізм лімфоцитів і його зміни при експериментальному цукровому діабеті. *Патологія*. 2016;3(38):102–8.
54. Lage R, Carlos Diéguez, Antonio Vidal-Puig, López M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med*.

- 2008;14(12):539–49.
55. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Nabee B. The Kinase LKB1 Mediates Glucose Homeostasis in Liver and Therapeutic Effects of Metformin. *Science*. 2005;310(45754):1642–6.
 56. Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct cis-acting sequences. *J Biol Chem*. 1995;270(49):29083–9.
 57. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*. 2000;348(3):607–14.
 58. Zheng J, Woo S, Hu X, Botchlett R, Chen L, Huo Y, et al. Metformin and metabolic diseases: a focus on hepatic aspects. *Front Med*. 2015;9(2):173–86.
 59. Ouyang J, Parakhia RA, Ochs RS. Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase. *J Biol Chem*. 2011;286(1):1–11.
 60. Kaminskiy OV. Official criteria for diagnostics of diabetes mellitus, normoglycemia and glycemic self-control. *Int J Endocrinol*. 2017;13(3):184–90.
 61. Dhalla NS, Rangi S, Zieroth S, Xu YJ. Alterations in sarcoplasmic reticulum and mitochondrial functions in diabetic cardiomyopathy. *Exp Clin Cardiol*. 2012;17(3):115–20.
 62. Zhi YF, Prins JB, Marwick TH. Diabetic cardiomyopathy: Evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev*. 2004;25(4):543–67.
 63. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi SI, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000;404(6779):787–90.
 64. Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, James Kang Y. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: Mitochondrial cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes*. 2002;51(6):1938–48.
 65. Van De Weijer T, Schrauwen-Hinderling VB, Schrauwen P. Lipotoxicity in type 2 diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2011;92(1):10–8.

66. Aragno M, Mastrocola R, Medana C, Catalano MG, Vercellinatto I, Danni O, et al. Oxidative stress-dependent impairment of cardiac-specific transcription factors in experimental diabetes. *Endocrinology*. 2006;147(12):5967–74.
67. Singh F, Charles AL, Schlagowski AI, Bouitbir J, Bonifacio A, Piquard F, et al. Reductive stress impairs myoblasts mitochondrial function and triggers mitochondrial hormesis. *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Res*. 2015;1853(7):1574–85.
68. Zhang C, Huang C, Tian Y, Li X. Polyol pathway exacerbated ischemia/reperfusion-induced injury in steatotic liver. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:1–9.
69. Clark RJ, McDonough PM, Swanson E, Trost SU, Suzuki M, Fukuda M, et al. Diabetes and the Accompanying Hyperglycemia Impairs Cardiomyocyte Calcium Cycling through Increased Nuclear O-GlcNAcylation. *J Biol Chem*. 2003;278(45):44230–7.
70. Galvez AS, Ulloa JA, Chiong M, Criollo A, Eisner V, Barros LF, et al. Aldose reductase induced by hyperosmotic stress mediates cardiomyocyte apoptosis. Differential effects of sorbitol and mannitol. *J Biol Chem*. 2003;278(40):38484–94.
71. Rijzewijk LJ, van der Meer RW, Lamb HJ, de Jong HW, Lubberink M, Romijn JA, et al. Altered myocardial substrate metabolism and decreased diastolic function in nonischemic human diabetic cardiomyopathy: studies with cardiac positron emission tomography and magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(16):1524–32.
72. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106(2):171–6.
73. Poornima IG, Parikh P, Shannon RP. Diabetic cardiomyopathy: The search for a unifying hypothesis. *Circ Res*. 2006;98(5):596–605.
74. Liu JE, Palmieri V, Roman MJ, Bella JN, Fabsitz R, Howard B V., et al. The impact of diabetes on left ventricular filling pattern in normotensive and hypertensive adults: The strong heart study. *J Am Coll Cardiol*.

- 2001;37(7):1943–9.
75. Rutter MK, Parise H, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Meigs JB, et al. Impact of glucose intolerance and insulin resistance on cardiac structure and function: Sex-related differences in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2003;107(3):448–54.
 76. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998;93(2):215–28.
 77. Hart G. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*. 1999;25(2):1276–83.
 78. Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol*. 1997;59(1):551–71.
 79. Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the Heart: A New Therapeutic Target? *Circulation*. 2004;109(13):1580–9.
 80. Dorn GW, Robbins J, Sugden PH. Phenotyping hypertrophy: Eschew obfuscation. *Circ Res*. 2003;92(11):1171–5.
 81. Iacobellis G, Ribaldo MC, Zappaterreno A, Vecci E, Tiberti C, Di Mario U, et al. Relationship of insulin sensitivity and left ventricular mass in uncomplicated obesity. *Obes Res*. 2003;11(4):518–24.
 82. McNulty PH. Insulin resistance and cardiac mass: The end of the beginning? *Obes Res*. 2003;11(4):507–8.
 83. Feng B, Chen S, Chiu J, George B, Chakrabarti S. Regulation of cardiomyocyte hypertrophy in diabetes at the transcriptional level. *Am J Physiol – Endocrinol Metab*. 2008;294(6):1119–26.
 84. Kaur H, Chen S, Xin X, Chiu J, Khan ZA, Chakrabarti S. Diabetes-induced extracellular matrix protein expression is mediated by transcription coactivator p300. *Diabetes*. 2006;55(11):3104–11.
 85. Gill C, Mestral R, Samali A. Losing heart: The role of apoptosis in heart disease – A novel therapeutic target? *FASEB J*. 2002;16(2):135–46.
 86. Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N. Myocyte death in the failing human heart

- is gender dependent. *Circ Res.* 1999;85(9):856–66.
87. Borner C, Monney L. Apoptosis without caspases: An inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ.* 1999;6(6):497–507.
 88. Nancy A, Thornberry YL. Caspases: Enemies Within. *Science* . 1998;281(5381):1312–6.
 89. Clerk A, Cole SM, Cullingford TE, Harrison JG, Jormakka M. Regulation of cardiac myocyte cell death. *Pharmacol Ther.* 2003;97(3):223–61.
 90. Деміхова НВ, Псарьова ВГ, Климанська НВ, Тучинська МА, Вільхова ІВ. Імунопатологічні механізми розвитку хронічної серцевої недостатності. *Вісник СумДУ.* 2006;8(92):101–8.
 91. Li B, Setoguchi M, Wang X, Andreoli AM, Leri A, Malhotra A, et al. Insulin-like growth factor-1 attenuates the detrimental impact of nonocclusive coronary artery constriction on the heart. *Circ Res.* 1999;84(9):1007–19.
 92. Červinka M. The role of mitochondria in apoptosis induced in vitro. *Annu Rev Genet.* 2009;43:95–118.
 93. Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S, Houtzager VM, Seiden I, Keen S, et al. Cell death attenuation by “Usurpin”, a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ.* 1998;5(4):271–88.
 94. Mizushige K, Yao L, Noma T, Kiyomoto H, Yu Y, Hosomi N, et al. Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin-resistant prediabetic stage of a type II diabetic rat model. *Circulation.* 2000;101(8):899–907.
 95. Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res.* 2008;58(2):88–111.
 96. From M, Heart C, With D, Subjects D, Prior W, Infarction M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1998;339(4):229–34.
 97. Jensen LO, Maeng M, Thyssen P, Tilsted HH, Terkelsen CJ, Kaltoft A, et al.

- Influence of diabetes mellitus on clinical outcomes following primary percutaneous coronary intervention in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2012;109(5):629–35.
98. Inthachai T, Lekawanvijit S, Kumfu S, Apaijai N, Pongkan W, Chattipakorn SC, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor improves cardiac function by attenuating adverse cardiac remodelling in rats with chronic myocardial infarction. *Exp Physiol.* 2015;100(6):667–79.
 99. Gjesdal O, Bluemke DA, Lima JA. Cardiac remodeling at the population level—risk factors, screening, and outcomes. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8(12):673–85.
 100. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):569–82.
 101. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res.* 2012;110(1):159–73.
 102. Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(11–12):1907–39.
 103. Lambert JM, Lopez EF, Lindsey ML. Macrophage roles following myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2008;130(2):147–58.
 104. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev Y V. CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Lab Investig.* 2017;97(1):4–13.
 105. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res.* 2004;94(12):1543–53.
 106. Soraya H, Rameshrad M, Mekarizadeh A, Garjani A. Metformin attenuates myocardial remodeling and neutrophil recruitment after myocardial infarction in rat. *BioImpacts.* 2015;5(1):3–8.
 107. Timmers L, Sluijter J, Van Keulen JK, Hofer IE, Nederhoff M, Goumans MJ, et al. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res.* 2008;102(2):257–64.

108. Shinde A, Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;70:74–82.
109. Dobaczewski M, Xia Y, Bujak M, Gonzalez-Quesada C. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *Am J Pathol.* 2010;176(5):2177–87.
110. Bujak M, Ren G, Kweon HJ, Dobaczewski M, Reddy A, Taffet G, et al. Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling. *Circulation.* 2007;116(19):2127–38.
111. Malmberg K, Rydén L, Wedel H, Birkeland K, Bootsma A, Dickstein K, et al. Intense metabolic control by means of insulin in patients with diabetes mellitus and acute myocardial infarction (DIGAMI 2): Effects on mortality and morbidity. *Eur Heart J.* 2005;26(7):650–61.
112. Orogo AM, Gustafsson ÅB. Therapeutic targeting of autophagy potential and concerns in treating cardiovascular disease. *Circ Res.* 2015;116(3):489–503.
113. Boulton A, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, et al. Diabetic neuropathies: A statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2005;28(4):956–62.
114. Aaron I. Vinik, Raelene E. Maser, Braxton D. Mitchell, Roy F. Neuropatía autonómica en diabetes. *Diabetes Care.* 2003;26(5):1553–79.
115. Pop-Busui R. Cardiac autonomic neuropathy in diabetes: A clinical perspective. *Diabetes Care.* 2010;33(2):434–41.
116. Acar E, Ural D, Bildirici U, Şahin T, Yilmaz I. Diabetic cardiomyopathy. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2011;11(8):732–7.
117. Howorka K, Pumpřla J, Haber P, Koller-Strametz J, Jerzy Mondrzyk, Schabmann A. Effects of physical training on heart rate variability in diabetic patients with various degrees of cardiovascular autonomic neuropathy. *Am J Cardiol.* 1997;34(2):206–14.
118. Singh JP, Larson MG, O'Donnell CJ, Wilson PF, Tsuji H, Lloyd-Jones DM, et al. Association of hyperglycemia with reduced heart rate variability (The

- Framingham Heart Study). *Am J Cardiol.* 2000;86(3):309–12.
119. Nesti L, Natali A. Metformin effects on the heart and the cardiovascular system: a review of experimental and clinical data. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2017;27(8):657–69.
 120. Kim J, Kwak HJ, Cha JY, Jeong YS, Rhee SD, Kim KR, et al. Metformin suppresses lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in murine macrophages via Activating Transcription Factor-3 (ATF-3) induction. *J Biol Chem.* 2014;289(33):23246–55.
 121. Bułdak Ł, Łabuzek K, Bułdak RJ, Kozłowski M, MacHnik G, Liber S, et al. Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacol Reports.* 2014;66(3):418–29.
 122. Bułdak Ł, Łabuzek K, Bułdak RJ, Machnik G, Bołdys A, Basiak M, et al. Metformin reduces the expression of NADPH oxidase and increases the expression of antioxidative enzymes in human monocytes/macrophages cultured in vitro. *Exp Ther Med.* 2016;11(3):1095–103.
 123. Vasamsetti SB, Karnewar S, Kanugula AK, Thatipalli AR, Kumar JM, Kotamraju S. Metformin inhibits monocyte- To-macrophage differentiation via AMPK-mediated inhibition of STAT3 activation: Potential role in atherosclerosis. *Diabetes.* 2015;64(6):2028–41.
 124. Satapati S, Browning JD, Shawn C, Satapati S, Kucejova B, Duarte J, et al. Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver. *J Clin Invest.* 2015;125(12):4447–62.
 125. Mahrouf M, Ouslimani N, Peynet J, Djelidi R, Couturier M, Therond P, et al. Metformin reduces angiotensin-mediated intracellular production of reactive oxygen species in endothelial cells through the inhibition of protein kinase C. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(2):176–83.
 126. Kelly B, Tannahill GM, Murphy MP, O'Neill L. Metformin inhibits the

- production of reactive oxygen species from NADH: Ubiquinone oxidoreductase to limit induction of interleukin-1 β (IL-1 β) and boosts interleukin-10 (IL-10) in lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages. *J Biol Chem.* 2015;290(33):20348–59.
127. Lee JH, Kim JH, Kim JS, Chang JW, Kim SB, Park JS, et al. AMP-activated protein kinase inhibits TGF- β -, angiotensin II-, aldosterone-, high glucose-, and albumin-induced epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol – Ren Physiol.* 2013;304(6):686–97.
128. Hernández JS, Barreto-Torres G, Kuznetsov AV., Khuchua Z, Javadov S. Crosstalk between AMPK activation and angiotensin II-induced hypertrophy in cardiomyocytes: The role of mitochondria. *J Cell Mol Med.* 2014;18(4):709–20.
129. Evans JM, Doney AS, AlZadjali MA, Ogston SA, Petrie JR, Morris AD, et al. Effect of Metformin on mortality in patients with heart failure and type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2010;106(7):1006–10.
130. Aguilar D, Chan W, Bozkurt B, Ramasubbu K, Deswal A. Metformin use and mortality in ambulatory patients with diabetes and heart failure. *Circ Hear Fail.* 2011;4(1):53–8.
131. Romero SP, Andrey JL, Garcia-Egido A, Escobar MA, Perez V, Corzo R, et al. Metformin therapy and prognosis of patients with heart failure and new-onset diabetes mellitus. *Int J Cardiol.* 2013;166(2):404–12.
132. Eurich DT, Weir DL, Majumdar SR, Tsuyuki RT, Johnson JA, Tjosvold L, et al. Comparative safety and effectiveness of metformin in patients with diabetes mellitus and heart failure systematic review of observational studies involving 34 000 patients. *Circ Hear Fail.* 2013;6(3):395–402.
133. Hong J, Zhang Y, Lai S, Ning G. Effects of metformin versus glipizide on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Diabetes Care.* 2014;37(1):19–20.
134. Паньків В.І. Ефективність застосування метформіну при цукровому діабеті 2-го типу: кардіоваскулярні, протективні та метаболічні ефекти.

- Міжнародний ендокринологічний журнал. 2013;2(50):41–6.
135. Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med.* 2002;346(6):393–403.
 136. Fontbonne A, Diouf I, Baccara-Dinet M, Eschwege E, Charles MA. Effects of 1-year treatment with metformin on metabolic and cardiovascular risk factors in non-diabetic upper-body obese subjects with mild glucose anomalies: A post-hoc analysis of the BIGPRO1 trial. *Diabetes Metab.* 2009;35(5):385–91.
 137. Gambineri A, Patton L, Vaccina A, Cacciari M, Morselli-Labate AM, Cavazza C, et al. Treatment with flutamide, metformin, and their combination added to a hypocaloric diet in overweight-obese women with polycystic ovary syndrome: A randomized, 12-month, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(10):3970–80.
 138. Pladevall M, Riera-Guardia N, Margulis AV, Varas-Lorenzo C, Calingaert B, Perez-Gutthann S. Cardiovascular risk associated with the use of glitazones, metformin and sulfonylureas: Meta-analysis of published observational studies. *BMC Cardiovasc Disord.* 2016;16(1):777–80.
 139. Yin M, van der Horst I, van Melle JP, Qian C, van Gilst WH, Silljé H, et al. Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Am J Physiol – Hear Circ Physiol.* 2011;301(2):459–6.
 140. Gundewar S, Calvert JW, Jha S, Toedt-Pingel I, Ji SY, Nunez D, et al. Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure. *Circ Res.* 2009;104(3):403–11.
 141. Solskov L, Løfgren B, Kristiansen SB, Jessen N, Pold R, Nielsen TT, et al. Metformin induces cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury in the rat heart 24 hours after administration. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;103(1):82–7.
 142. Lexis CP, Wieringa WG, Hiemstra B, van Deursen VM, Lipsic E, van der Harst P, et al. Chronic metformin treatment is associated with reduced myocardial

- infarct size in diabetic patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Cardiovasc drugs Ther.* 2014;28(2):163–71.
143. Basnet S, Kozikowski A, Makaryus AN, Pekmezaris R, Zeltser R, Akerman M, et al. Metformin and myocardial injury in patients with diabetes and ST-segment elevation myocardial infarction: A propensity score matched analysis. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(10):1–7.
144. El Messaoudi S, Rongen GA, Riksen NP. Metformin therapy in diabetes: the role of cardioprotection. *Curr Atheroscler Rep.* 2013;15(4):314–30.
145. Chan AY, Soltys CL, Young ME, Proud CG, Dyck JR. Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte. *J Biol Chem.* 2004;279(31):32771–9.
146. Cha HN, Choi JH, Kim YW, Kim JY, Ahn MW, Park SY. Metformin inhibits isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in mice. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2010;14(6):377–84.
147. Hu M, Ye P, Liao H, Chen M, Yang F. Metformin Protects H9C2 Cardiomyocytes from High-Glucose and Hypoxia/Reoxygenation Injury via Inhibition of Reactive Oxygen Species Generation and Inflammatory Responses: Role of AMPK and JNK. *J Diabetes Res.* 2016;2016:1–6.
148. Paiva MA, Gonçalves LM, Providência LA, Davidson SM, Yellon DM, Mocanu MM. Transitory activation of AMPK at reperfusion protects the ischaemic-reperfused rat myocardium against infarction. *Cardiovasc drugs Ther.* 2010;24(1):25–32.
149. Li X, Kover KL, Heruth DP, Watkins DJ, Moore WV, Jackson K, et al. New insight into metformin action: Regulation of chREBP and FOXO1 activities in endothelial cells. *Mol Endocrinol.* 2015;29(8):1184–94.
150. Arunachalam G, Samuel SM, Marei I, Ding H, Triggle CR. Metformin modulates hyperglycaemia-induced endothelial senescence and apoptosis through SIRT1. *Br J Pharmacol.* 2014;171(2):523–35.
151. Kim YD, Park K, Lee Y, Park Y, Kim D, Nedumaran B, et al. Metformin Inhibits Hepatic Gluconeogenesis Through AMP-Activated Protein Kinase–

- Dependent Regulation of the Orphan Nuclear Receptor SHP. *Diabetes*. 2008;57:306–14.
152. Zou J, Hong L, Luo C, Li Z, Zhu Y, Huang T, et al. Metformin inhibits estrogen-dependent endometrial cancer cell growth by activating the AMPK–FOXO1 signal pathway. *Cancer Sci*. 2016;107(12):1806–17.
 153. Kandula V, Kosuru R, Li H, Yan D, Zhu Q, Lian Q, et al. Forkhead box transcription factor 1: Role in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15(1):1–12.
 154. Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci*. 2007;120(15):2479–87.
 155. Eijkelenboom A, Burgering BM. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol cell Biol*. 2013;14(2):83–97.
 156. Watkins SJ, Borthwick GM, Arthur HM. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *Vitr Cell Dev Biol – Anim*. 2011;47(2):125–31.
 157. Pirkmajer S, Chibalin AV. Serum starvation: Caveat emptor. *Am J Physiol – Cell Physiol*. 2011;301(2):272–9.
 158. Elf S, Chen J. Targeting glucose metabolism in patients with cancer. *Cancer*. 2014;120(6):774–80.
 159. Wang J, Song Y, Wang Q, Kralik PM, Epstein PN. Causes and characteristics of diabetic cardiomyopathy. *Rev Diabet Stud*. 2006;3(3):108–17.
 160. Cole MA, Abd Jamil AH, Heather LC, Murray AJ, Sutton ER, Slingo M, et al. On the pivotal role of PPAR α in adaptation of the heart to hypoxia and why fat in the diet increases hypoxic injury. *FASEB J*. 2016;30(8):2684–97.
 161. Battiprolu PK, Hojayev B, Jiang N, Wang ZV., Luo X, Iglewski M, et al. Metabolic stress – induced activation of FoxO1 triggers diabetic cardiomyopathy in mice. *J Clin Invest*. 2012;122(3):1109–18.
 162. Mcgaffin KR, Zou B, Mctiernan CF, O’donnell CP. Leptin attenuates cardiac apoptosis after chronic ischaemic injury. *Cardiovasc Res*. 2009;83(2):313–24.
 163. Loi H, Boal F, Tronchere H, Cinato M, Kramar S, Oleshchuk O, et al.

Metformin protects the heart against hypertrophic and apoptotic remodeling after myocardial infarction. *Front Pharmacol* [Internet]. 2019;10(154):1-19.

Available from:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00154/full>

DOI: 10.3389/fphar.2019.00154.

164. Пасечко Н.В., Лой ГЯ, Корда ММ, Олещук ОМ. Роль експресії гена Foxo1 у механізмі антигіпертрофічної дії метформіну в кардіоміоцитах. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2018;14(7):705–11.
165. Лой ГЯ, Олещук ОМ. Вплив метформіну на гіпертрофію H9C2 клітини в умовах метаболічного стресу та гіпоксії. В: Шевчук ОО, редактор. *Матеріали підсумкової LXI наук.-практ. конф. Здобутки клінічної та експериментальної медицини*; 2018 Черв 7; Тернопіль. Тернопіль: ТДМУ; 2018, с. 245.
166. Лой ГЯ, Олещук ОМ. Вплив метформіну на апоптоз H9C2 клітини в умовах метаболічного стресу та гіпоксії. В: Андрейчин СМ, редактор. *Збірник матеріалів Всеукр. наук.-практ. конф. Сучасні аспекти діагностики і лікування захворювань внутрішніх органів*; 2018 Жовт 11-12; Тернопіль. Тернопіль: ТДМУ; 2018, с. 36.
167. Лой ГЯ. Механізм кардіопротективної дії препарату метформін. В: Корда ММ, редактор. *Матеріали XXIII Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*; 2019 Квіт 15-17; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2018, с.36.
168. Лой ГЯ, Олещук ОМ. Кардіопротективні ефекти препарату метформін в умовах метаболічного стресу та гіпоксії. *Медична та клінічна хімія*. 2019;3(80),(додаток):210.
169. Лой ГЯ, Олещук ОМ. Значення експресії гена FOXO1 у механізмі дії метформіну в H9C2 клітинах. В: Думенко ТМ, редактор. *Матеріали науково-практичної конференції «Безпека та нормативно-правовий супровід лікарських засобів: від розробки до медичного застосування»*, 2019 Жовт 22-23, Київ. Київ: ДП "ДЕЦ" МОЗ України, 2019, с.25–6.

170. Лой ГЯ, Олещук ОМ, Корда ММ, винахідники; ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України, патентовласник. Спосіб встановлення механізму антиапоптичної дії метформіну. Патент України № 120567. 2019 Груд 26.
171. Frank A, Bonney M, Bonney S, Weitzel L, Koeppen M, Eckle T. Myocardial ischemia reperfusion injury – from basic science to clinical bedside. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2012;16(3):123–32.
172. Yu L, Gong B, Duan W, Fan C, Zhang J, Li Z, et al. Melatonin ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in type 1 diabetic rats by preserving mitochondrial function: Role of AMPK-PGC-1 α -SIRT3 signaling. *Sci Rep.* 2017;7:1–13.
173. Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther.* 2012;33(2):230–55.
174. Zhu X, Zuo L, Cardounel AJ, Zweier JL, He G. Characterization of in vivo tissue redox status, oxygenation, and formation of reactive oxygen species in postischemic myocardium. *Antioxidants Redox Signal.* 2007;9(4):447–55.
175. Enomoto S, Yoshiyama M, Omura T, Matsumoto R, Kusuyama T, Kim S, et al. Effects of eplerenone on transcriptional factors and mRNA expression related to cardiac remodelling after myocardial infarction. *Heart.* 2005;91:1595–600.
176. Tardiff JC, Hewett TE, Factor SM, Vikstrom KL, Robbins J, Leinwand LA. Expression of the β (slow)-isoform of MHC in the adult mouse heart causes dominant-negative functional effects. *Am J Physiol Hear Physiol.* 2000;278:412–9.
177. Jones WK, Grupp IL, Doetschman T, Grupp G, Osinska H, Hewett TE, et al. Ablation of the murine α myosin heavy chain gene leads to dosage effects and functional deficits in the heart. *J Clin Invest.* 1996;98(8):1906–17.
178. Barouch LA, Gao D, Chen L, Miller KL, Xu W, Phan AC, et al. Cardiac myocyte apoptosis is associated with increased DNA damage and decreased survival in murine models of obesity. *Circ Res.* 2006;98(1):119–24.

179. Van Den Borne SW, Diez J, Blankesteyn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J. Myocardial remodeling after infarction: The role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7(1):30–7.
180. Pandya K, Kim HS, Smithies O. Fibrosis, not cell size, delineates β -myosin heavy chain reexpression during cardiac hypertrophy and normal aging in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(45):16864–9.
181. Weber KT, Sun Y, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Gerling IC. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodeling of the heart. *Nat Rev Cardiol.* 2013;10(1):15–26.
182. De Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, Gibson CM, Antman EM, et al. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003;107(5):690–5.
183. Лой ГЯ, Олещук ОМ, Корда ММ. Вплив метформіну на експресію α - та β -МНС генів після інфаркту міокарда у мишей. *Вісник Наукових Досліджень.* 2019;(2):90–4.
184. Лой Г.Я. Олещук О.М. Метформін запобігає кардіальному ремоделюванню, зумовленому ішемією-реперфузією. В: Олещук ОМ, редактор. *Актуальні питання фармакології та фармакотерапії; 2019 Вер 26-27; Тернопіль. Тернопіль: ТНМУ; 2018, с. 43.*
185. Лой Г. Влияние метформина на экспрессию каспазы-3 после инфаркта миокарда у мыш. В: Абенова НА, редактор. *I международная дистанционная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Future perspectives of science and education»; 2019 Май 16-17; Актобе. Актобе: 2019, с. 200–1.*
186. Thomsen M, Nordestgaard BG. Myocardial infarction and ischemic heart disease in overweight and obesity with and without metabolic syndrome. *JAMA Intern Med.* 2014;174(1):15–22.
187. Радченко ОМ. Стимуляція та блокада адренорецепторів кардіоміоцитів (огляд літератури). *Кровообіг та гемостаз.* 2008;2:21–4.

188. Tarvainen MP, Laitinen TP, Lipponen JA, Cornforth DJ, Jelinek HF. Cardiac autonomic dysfunction in type 2 diabetes – effect of hyperglycemia and disease duration. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:1–9.
189. Srinivasan S, Ambler GR, Baur LA, Garnett SP, Tepsa M, Yap F, et al. Randomized, controlled trial of metformin for obesity and insulin resistance in children and adolescents: Improvement in body composition and fasting insulin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(6):2074–80.
190. Zeyda M, Stulnig TM. Obesity, inflammation, and insulin resistance – A mini-review. *Gerontology*. 2009;55(4):379–86.
191. Котелюх МЮ. Вплив міжклітинного матриксу на стан коронарних артерій у хворих на гострий інфаркт міокарда та цукровий діабет 2 типу. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2016;16(1):125–8.
192. Ocaranza MP, Díaz-Araya G, Chiong M, Muñoz D, Riveros JP, Ebensperger R, et al. Isoproterenol and angiotensin I-converting enzyme in lung, left ventricle, and plasma during myocardial hypertrophy and fibrosis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;40(2):246–54.
193. Siddiqui MA, Ahmad U, Khan AA, Ahmad M, Badruddeen, Khalid M, et al. Isoprenaline: a Tool for Inducing Myocardial Infarction in Experimental Animals. *Int J Pharm*. 2016;6(1):1318–26.
194. Quan He, Guiyun Wu, LaPointe MC. Isoproterenol and cAMP regulation of the human brain natriuretic peptide gene involves Src and Rac. *Am J Physiol – Endocrinol Metab*. 2000;278:1115–23.
195. Brooks WW, Conrad CH. Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: Structural and functional correlates. *Comp Med*. 2009;59(4):339–43.
196. Li L, Zhang Y, Li Y, Yu B, Xu Y, Zhao SD, et al. Mesenchymal stem cell transplantation attenuates cardiac fibrosis associated with isoproterenol-induced global heart failure. *Transpl Int*. 2008;21(12):1181–9.
197. Loi H. Ya., Pavliuk B.V., Kramar S.B., Korda M.M, Oleshchuk OM. Metformin exerts cardioprotection in isoproterenol-induced cardiomyopathy in

- rats. *Med Clin Chem*. 2019;4:69–77.
198. Wang CC, Hess CN, Hiatt WR, Goldfine AB. Clinical update: Cardiovascular disease in diabetes mellitus: Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus – Mechanisms, Management, and Clinical Consideration. *Circulation*. 2016;133:2459–502.
199. Амбросова ТМ. Ефективність застосування метформіну при цукровому діабеті 2-го типу: кардіоваскулярні, протективні та метаболічні ефекти. *Експериментальна і клінічна медицина*. 2013;3(60):35–40.
200. Fu YN, Xiao H, Ma XW, Jiang SY, Xu M, Zhang YY. Metformin attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy via AMPK activation. *Acta Pharmacol Sin*. 2011;32(7):879–87.
201. Ni YG, Berenji K, Wang N, Oh M, Sachan N, Dey A, et al. Foxo Transcription Factors Blunt Cardiac Hypertrophy by Inhibiting Calcineurin Signaling. *Circulation*. 2006;114(11):1159–68.
202. Davis TM, Fortun P, Mulder J, Davis WA, Bruce DG. Silent myocardial infarction and its prognosis in a community-based cohort of Type 2 diabetic patients: The Fremantle Diabetes Study. *Diabetologia*. 2004;47(3):395–9.
203. Chin JT, Troke JJ, Kimura N, Itoh S, Wang X, Palmer OP, et al. A novel cardioprotective agent in cardiac transplantation: Metformin activation of AMP-activated protein kinase decreases acute ischemia-reperfusion injury and chronic rejection. *Yale J Biol Med*. 2011;84(4):423–32.
204. Whittington HJ, Hall AR, McLaughlin CP, Hausenloy DJ, Yellon DM, Mocanu MM. Chronic metformin associated cardioprotection against infarction: not just a glucose lowering phenomenon. *Cardiovasc drugs Ther*. 2013;27(1):5–16.
205. Calvert JW, Gundewar S, Jha S, Greer JJ, Bestermann WH, Tian R, et al. Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS- mediated signaling. *Diabetes*. 2008;57(3):696–705.
206. Кравчук ЕН, Гринева ЕН, Смолина НА, Худяков АА, Галагудза ММ, Kravchuk EN, et al. Влияние метформина на устойчивость миокарда к ишемии-реперфузии при сахарном диабете 2 типа в эксперименте и в

- клинической практике. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2013;12(4):81–7.
207. Nunes S, Soares E, Fernandes J, Viana S, Carvalho E, Pereira FC, et al. Early cardiac changes in a rat model of prediabetes: Brain natriuretic peptide overexpression seems to be the best marker. *Cardiovasc Diabetol.* 2013;12(1):1–11.
208. Romano S, Di Mauro M, Fratini S, Guarracini L, Guarracini F, Poccia G, et al. Early diagnosis of left ventricular diastolic dysfunction in diabetic patients: A possible role for natriuretic peptides. *Cardiovasc Diabetol.* 2010;9:1–7.
209. Ashour AE, Sayed-Ahmed MM, Abd-Allah AR, Korashy HM, Maayah ZH, Alkhalidi H, et al. Metformin rescues the myocardium from doxorubicin-induced energy starvation and mitochondrial damage in rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:1–13.
210. Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med.* 1996;335:1182–9.
211. Li J, Gui Y, Ren J, Liu X, Feng Y, Zeng Z, et al. Metformin protects against cisplatin-induced tubular cell apoptosis and acute kidney injury via AMPK α -regulated autophagy induction. *Sci Rep.* 2016;6:1–11.
212. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13(15):1899–911.
213. An D, Kewalramani G, Chan J, Qi D, Ghosh S, Pulinilkunnil T, et al. Metformin influences cardiomyocyte cell death by pathways that are dependent and independent of caspase-3. *Diabetologia.* 2006;49(9):2174–84.
214. Воротникова СЮ. Метформин защищает гепатоциты от стресс-индуцированного апоптоза. *Ожирение и метаболизм.* 2015;12(4):59–65.
215. Pang R, Guan M, Zheng Z, Xue Y. Effects of metformin on apoptosis induced by advanced glycation end-products and expressions of caspase-3, Bax and Bcl-2 in human dermal fibroblasts in vitro. *J South Med Univ.* 2015;35(6):898–902.
216. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair and

- remodeling. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11(5):255–65.
217. Soraya H, Clanachan AS, Rameshrad M, Maleki-Dizaji N, Ghazi-Khansari M, Garjani A. Chronic treatment with metformin suppresses toll-like receptor 4 signaling and attenuates left ventricular dysfunction following myocardial infarction. *Eur J Pharmacol.* 2014;737:77–84.
218. Бабак ОЯ, Кравченко НА, Степанова ЕВ. Роль тиазолидиндионов в коррекции функциональных и морфологических изменений адипоцитов при инсулинорезистентности, связанной с ожирением. *Укр терапевт журн.* 2009;1:33–9.
219. Niu J, Kolattukudy PE. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci.* 2009;117(3):95–109.
220. Fuchs M, Hilfiker A, Kaminski K, Hilfiker-Kleiner D, Guener Z, Klein G, et al. Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction. *FASEB J.* 2003;17(14):2118–20.
221. Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, et al. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97(10):5456–61.
222. Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2002;91(12):1103–13.
223. Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol.* 1995;147(2):325–38.
224. Xiao H, Ma X, Feng W, Fu Y, Lu Z, Xu M, et al. Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGF1-Smad3 signalling pathway. *Cardiovasc Res.* 2010;87(3):504–13.
225. Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO. Obesity and Cardiovascular Disease. Risk Factor, Paradox, and Impact of Weight Loss. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(21):1925–32.
226. Carbone S, Lavie CJ, Arena R. Obesity and Heart Failure: Focus on the Obesity Paradox. *Mayo Clin Proc.* 2017;92(2):266–79.

227. Lavie CJ, Sharma A, Alpert MA, De Schutter A, Lopez-Jimenez F, Milani RV, et al. Update on Obesity and Obesity Paradox in Heart Failure. *Prog Cardiovasc Dis.* 2016;58(4):393–400.
228. Min HP, Kinra S, Ward KJ, White B, Viner RM. Metformin for obesity in children and adolescents: A systematic review. *Diabetes Care.* 2009;32(9):1743–5.
229. Golay A. Metformin and body weight. *Int J Obes.* 2008;32(1):61–72.
230. Seifarth C, Schehler B, Schneider HJ. Effectiveness of metformin on weight loss in non-diabetic individuals with obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2013;121(1):27–31.
231. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity.* 2007;15(4):798–808.
232. Warden CH, Fisler JS. Comparisons of diets used in animal models of high fat feeding. *Cell Metab.* 2008;7(4):277–80.
233. Дуб АІ, Кліщ ІМ, Вронська ЛВ, Стечишин ІІ. Вплив нової фітокомпозиції на спектр ліпідів крові на моделі гіперліпідемії в щурів. *Фармакологія та лікарська токсикологія.* 2018;5(60):32–7.
234. Lokhande Suryabhan L, Iyer Chandrashekhar M, Shinde Ratnendra R, Nandedkar Prerna D. A comparative study on the fasting and the postprandial dyslipidaemia in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Diagnostic Res.* 2013;7(4):627–30.
235. Sato D, Morino K, Nakagawa F, Murata K, Sekine O, Beppu F, et al. Acute effect of metformin on postprandial hypertriglyceridemia through delayed gastric emptying. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6):1282–93.
236. Ouwens DM, Boer C, Fodor M, De Galan P, Heine RJ, Maassen JA, et al. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia.* 2005;48(6):1229–37.
237. Adam R. Wende, Abel ED. Lipotoxicity in the Heart Adam. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801(3):311–9.
238. Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME, Pham M, et al.

- Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest*. 2002;109(5):629–39.
239. Murphy S, Frishman WH. Protein kinase C in cardiac disease and as a potential therapeutic target. *Cardiol Rev*. 2005;13(1):3–12.
240. Zhuo XZ, Wu Y, Ni YJ, Liu JH, Gong M, Wang XH, et al. Isoproterenol instigates cardiomyocyte apoptosis and heart failure via AMPK inactivation-mediated endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis*. 2013;18(7):800–10.
241. Chowdhury D, Tangutur AD, Khatua TN, Saxena P, Banerjee SK, Bhadra MP. A proteomic view of isoproterenol induced cardiac hypertrophy: Prohibitin identified as a potential biomarker in rats. *J Transl Med*. 2013;11(1):130–43.
242. Ahmed AA, Ahmed AA, El Morsy EM, Nofal S. Dimethyl fumarate interferes with MyD88-dependent toll-like receptor signalling pathway in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy model. *J Pharm Pharmacol*. 2018;70(11):1521–30.
243. Vanderheyden M, Bartunek J, Goethals M. Brain and other natriuretic peptides: Molecular aspects. *Eur J Heart Fail*. 2004;6(3):261–8.
244. Ayala P, Montenegro J, Vivar R, Letelier A, Urroz PA, Copaja M, et al. Attenuation of endoplasmic reticulum stress using the chemical chaperone 4-phenylbutyric acid prevents cardiac fibrosis induced by isoproterenol. *Exp Mol Pathol*. 2012;92(1):97–104.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача

1. Loi H, Boal F, Tronchere H, Cinato M, Kramar S, Oleshchuk O, et al. Metformin protects the heart against hypertrophic and apoptotic remodeling after myocardial infarction. *Front Pharmacol* [Internet]. 2019;10(154):1-19. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00154/full> DOI: 10.3389/fphar.2019.00154 (Scopus);
2. Loi HYa, Pavliuk BV, Kramar SB, Korda MM, Oleshchuk OM. Metformin exerts cardioprotection in isoproterenol-induced cardiomyopathy in rats. *Med Clin Chem*. 2019;4:69–77;
3. Лой ГЯ, Олещук ОМ, Корда ММ. Вплив метформіну на експресію α -та β -МНС генів після інфаркту міокарда у мишей. *Вісник наукових досліджень*. 2019(2):90-4;
4. Пасечко НВ, Лой ГЯ, Корда ММ, Олещук ОМ. Роль експресії гена Foxo1 у механізмі антигіпертрофічної дії метформіну в кардіоміоцитах. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2018;14(7):705–11;
5. Лой ГЯ, Олещук ОМ, Корда ММ, винахідники; ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України, патентовласник. Спосіб встановлення механізму антиапоптичної дії метформіну. Патент України № 120567. 2019 Груд 26;
6. Лой ГЯ, Олещук ОМ. Вплив метформіну на гіпертрофію H9C2 клітини в умовах метаболічного стресу та гіпоксії. В: Шевчук ОО, редактор. *Матеріали підсумкової LXI наук.-практ. конф. Здобутки клінічної та експериментальної медицини*; 2018 Черв 7; Тернопіль. Тернопіль: ТДМУ; 2018, с. 245;
7. Лой ГЯ, Олещук ОМ. Вплив метформіну на апоптоз H9C2 клітини в умовах метаболічного стресу та гіпоксії. В: Андрейчин СМ, редактор.

- Збірник матеріалів Всеукр. наук.-практ. конф. Сучасні аспекти діагностики і лікування захворювань внутрішніх органів; 2018 Жовт 11-12; Тернопіль. Тернопіль: ТДМУ; 2018, с. 36;
8. Лой ГЯ. Механізм кардіопротективної дії препарату метформін. В: Корда ММ, редактор. Матеріали ХХІІІ Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2019 Квіт 15-17; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2018, с.36;
 9. Лой Г. Влияние метформина на экспрессию каспазы-3 после инфаркта миокарда у мыш. В: Абенова НА, редактор. I международная дистанционная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Future perspectives of science and education»; 2019 Май 16-17; Актобе. Актобе: 2019, с. 200–1;
 10. Лой Г.Я. Олещук О.М. Метформін запобігає кардіальному ремоделюванню, зумовленому ішемією-реперфузією. В: Олещук ОМ, редактор. Актуальні питання фармакології та фармакотерапії; 2019 Вер 26-27; Тернопіль. Тернопіль: ТНМУ; 2018, с. 43;
 11. Лой ГЯ, Олещук ОМ. Кардіопротективні ефекти препарату метформін в умовах метаболічного стресу та гіпоксії. Медична та клінічна хімія. 2019;3(80),(додаток):210;
 12. Лой ГЯ, Олещук ОМ. Значення експресії гена FOXO1 у механізмі дії метформіну в Н9С2 клітинах. В: Думенко ТМ, редактор. Матеріали науково-практичної конференції «Безпека та нормативно-правовий супровід лікарських засобів: від розробки до медичного застосування», 2019 Жовт 22-23, Київ. Київ: ДП "ДЕЦ" МОЗ України, 2019, с.25–6.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації:

- Підсумкова LXI науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (7 червня 2018 року, м. Тернопіль);
- Всеукраїнська науково-практична конференція «Сучасні аспекти діагностики і лікування захворювань внутрішніх органів» (11–12 жовтня 2018 року, м. Тернопіль);
- XXII Міжнародний медичний конгрес студентів і молодих вчених (15-17 квітня 2019 р., м. Тернопіль);
- I International distance scientific and practical conference of students and young scientist «Future perspectives of science and education» (16-17 May 2019, West Kazakhstan Marat Ospanov State Medical University);
- Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні питання фармакології та фармакотерапії» (26-27 вересня 2019 року, м. Тернопіль);
- XII Український біохімічний конгрес (30 вересня – 4 жовтня 2019 року, м. Тернопіль);
- Науково-практична конференція «Безпека та нормативно-правовий супровід лікарських засобів: від розробки до медичного застосування» (22-23 жовтня 2019 року, м. Київ).

ДОДАТОК В.1

ЗАТВЕРДЖУЮ»
 проректор з науково-педагогічної роботи
 Вищого державного навчального закладу України
 «Буковинський державний медичний університет»



Геруш Ігор Васильович
 _____ 20__ р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

1. **Назва пропозиції до впровадження:** Механізми кардіопротективної дії протидіабетичного препарату метформін.
2. **Заклад, де проведена розробка, адреса, ПІБ авторів:** Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра фармакології із клінічною фармакологією, Лой Г.Я.
3. **Джерела інформації:**
 - Лой Г.Я., Олещук ОМ, Корда ММ. Вплив метформіну на експресію α -та β -MHC генів після інфаркту міокарда у мишей. Вісник наукових досліджень. 2019(2):90-4.;
 - Loi H, Boal F, Tronchere H, Cinato M, Kramar S, Oleshchuk O, Korda M and Kunduzova O. Metformin protects the heart against hypertrophic and apoptotic remodeling after myocardial infarction. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10:154;
 - Пасечко НВ, Лой Г.Я., Корда ММ, Олещук ОМ. Роль експресії гена Foxo1 у механізмі антигіпертрофічної дії метформіну в кардіоміоцитах. Міжнародний ендокринологічний журнал. 2018(14,№ 7):705-11.

Метформін проявляє виражену кардіопротективну дію *in vivo* та *in vitro*. У концентрації 5 мМ метформін захищає кардіоміобласти ембріонів щурів (H9C2 клітини) від гіпертрофії та апоптозу, індукованих метаболічним стресом та гіпоксією. Анти-апоптотичний ефект метформіну в H9C2 клітинах залежить від активності гена Foxo1. Лікування метформіном у дозі 5 мг/кг через 30 хв після кардіальної ішемії-реперфузії та упродовж наступних 13 днів попереджує гіпертрофію, апоптоз, фіброз та запалення у міокарді, а також викликає даун-регуляцію фетальних генів. При ізопротеренолової кардіоміопатії метформін попереджає збільшення розмірів кардіоміоцитів, зменшує прояви фіброзу та пригнічує секрецію мозкового натрійуретичного пептиду.
4. **Впроваджено:** кафедра фармакології.
5. **Включено:** у лекційний курс та практичні заняття за темами.
6. **Результати впровадження:** використання результатів роботи Лой Г.Я. у навчальному процесі дозволяє поглибити знання студентів про фармакодинамічні ефекти протидіабетичного лікарського засобу метформін
7. **Термін впровадження:** 2019/2020 навчальний рік.
8. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження
 завідувач кафедри фармакології
 Вищого державного навчального закладу України
 «Буковинський державний
 медичний університет»
 доктор медичних наук, професор

Заморський Ігор Іванович

ДОДАТОК В.2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор ІФНМУ

Проф. Ерстенюк Г.М.
« _____ » _____ 20__ р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

1. **Назва пропозиції до впровадження:** Механізми кардіопротективної дії протидіабетичного препарату метформін.
2. **Заклад, де проведена розробка, адреса, ПІБ авторів:** Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра фармакології із клінічною фармакологією, Лой Г.Я.
3. **Джерела інформації:**
 - Лой Г.Я., Олещук ОМ, Корда ММ. Вплив метформіну на експресію α -та β -МНС генів після інфаркту міокарда у мишей. Вісник наукових досліджень. 2019(2):90-4.;
 - Loi H, Boal F, Tronchere H, Cinato M, Kramar S, Oleshchuk O, Korda M and Kunduzova O. Metformin protects the heart against hypertrophic and apoptotic remodeling after myocardial infarction. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10:154;
 - Пасечко НВ, Лой Г.Я., Корда ММ, Олещук ОМ. Роль експресії гена Foxo1 у механізмі антигіпертрофічної дії метформіну в кардіоміоцитах. Міжнародний ендокринологічний журнал. 2018(14, № 7):705-11.

Метформін проявляє виражену кардіопротективну дію *in vivo* та *in vitro*. У концентрації 5 мМ метформін захищає кардіоміобласти ембріонів щурів (H9C2 клітини) від гіпертрофії та апоптозу, індукованих метаболічним стресом та гіпоксією. Анти-апоптотичний ефект метформіну в H9C2 клітинах залежить від активності гена Foxo1. Лікування метформіном у дозі 5 мг/кг через 30 хв після кардіальної ішемії-реперфузії та упродовж наступних 13 днів попереджує гіпертрофію, апоптоз, фіброз та запалення у міокарді, а також викликає даун-регуляцію фетальних генів. При ізопротеренолової кардіоміопатії метформін попереджає збільшення розмірів кардіоміоцитів, зменшує прояви фіброзу та пригнічує секрецію мозкового натрійуретичного пептиду.
4. **Впроваджено:** кафедра фармакології.
5. **Включено:** у лекційний курс та практичні заняття за темами.
6. **Результати впровадження:** використання результатів роботи Лой Г.Я. у навчальному процесі дозволяє поглибити знання студентів про фармакодинамічні ефекти протидіабетичного лікарського засобу метформін
7. **Термін впровадження:** 2019/2020 навчальний рік.
8. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри фармакології
Івано-Франківського національного
медичного університету
доктор медичних наук, професор



ДОДАТОК В.3

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

проректор з наукової роботи та інновацій
Національного медичного університету

імені О.О. Богомольця

д. мед. н., професор Земсков С. В.

20 19 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

1. **Назва пропозиції до впровадження:** Механізми кардіопротективної дії протидіабетичного препарату метформін.
 2. **Заклад, де проведена розробка, адреса, ПІБ авторів:** Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра фармакології із клінічною фармакологією, Лой Г.Я.
 3. **Джерела інформації:**
 - Лой Г.Я, Олещук ОМ, Корда ММ. Вплив метформіну на експресію α -та β -МНС генів після інфаркту міокарда у мишей. Вісник наукових досліджень. 2019(2):90-4.;
 - Loi H, Boal F, Tronchere H, Cinato M, Kramar S, Oleshchuk O, Korda M and Kunduzova O. Metformin protects the heart against hypertrophic and apoptotic remodeling after myocardial infarction. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10:154;
 - Пасечко НВ, Лой Г.Я, Корда ММ, Олещук ОМ. Роль експресії гена Foxo1 у механізмі антигіпертрофічної дії метформіну в кардіоміоцитах. Міжнародний ендокринологічний журнал. 2018(14, № 7):705-11.

Метформін проявляє виражену кардіопротективну дію *in vivo* та *in vitro*. У концентрації 5 мМ метформін захищає кардіоміобласти ембріонів щурів (H9C2 клітини) від гіпертрофії та апоптозу, індукованих метаболічним стресом та гіпоксією. Анти-апоптотичний ефект метформіну в H9C2 клітинах залежить від активності гена Foxo1. Лікування метформіном у дозі 5 мг/кг через 30 хв після кардіальної ішемії-реперфузії та упродовж наступних 13 днів попереджує гіпертрофію, апоптоз, фіброз та запалення у міокарді, а також викликає даун-регуляцію фетальних генів. При ізопротереноловій кардіоміопатії метформін попереджує збільшення розмірів кардіоміоцитів, зменшує прояви фіброзу та пригнічує секрецію мозкового натрійуретичного пептиду.
 4. **Впроваджено:** в науково-педагогічний процес кафедри фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.
 5. **Результати впровадження:** використання результатів роботи Лой Г.Я. у навчальному процесі дозволяє поглибити знання студентів про фармакодинамічні ефекти протидіабетичного лікарського засобу метформін
 6. **Термін впровадження:** 2019/2020 навчальний рік.
 7. **Зауваження та пропозиції:** немає.
- Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, протокол № 7 від «25» «листопада» 2019 р.

Відповідальний за впровадження:
асистент кафедри фармакології
Національного медичного університету
імені О. О. Богомольця

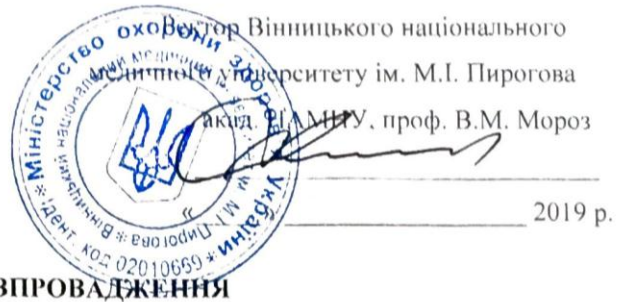
О. А. Сімонова

Завідувач кафедри фармакології,
д. мед. н., професор

Г. В. Зайченко

ДОДАТОК В.4

“ЗАТВЕРДЖУЮ”



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів наукових досліджень дисертанта кафедри фармакології із клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України Лой Г.Я. в науково-педагогічний процес

1. **Назва пропозиції до впровадження:** Механізми кардіопротективної дії протидіабетичного препарату метформін.

2. **Заклад, де проведена розробка, адреса, ПІБ авторів:** Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра фармакології із клінічною фармакологією, Лой Г.Я.

3. **Джерела інформації:**

1. Лой Г.Я, Олещук ОМ, Корда ММ. Вплив метформіну на експресію α -та β -МНС генів після інфаркту міокарда у мишей. Вісник наукових досліджень. 2019 (2):90-4.;
2. Loi H, Boal F, Tronchere H, Cinato M, Kramar S, Oleshchuk O, Korda M and Kunduzova O. Metformin protects the heart against hypertrophic and apoptotic remodeling after myocardial infarction. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10:154;
3. Пасечко НВ, Лой Г.Я, Корда ММ, Олещук ОМ. Роль експресії гена Foxo1 у механізмі антигіпертрофічної дії метформіну в кардіоміоцитах. Міжнародний ендокринологічний журнал. 2018(14, № 7):705-11.

Метформін проявляє виражену кардіопротективну дію *in vivo* та *in vitro*. У концентрації 5 мМ метформін захищає кардіоміобласти ембріонів шурів (H9C2 клітини) від гіпертрофії та апоптозу, індукованих метаболічним стресом та гіпоксією. Анти-апоптотичний ефект метформіну в H9C2 клітинах залежить від активності гена Foxo1. Лікування метформіном у дозі 5 мг/кг через 30 хв після кардіальної ішемії-реперфузії та упродовж наступних 13 днів попереджує гіпертрофію, апоптоз, фіброз та запалення у міокарді, а також викликає даун-регуляцію фетальних генів. При ізопротереноловій кардіоміопатії метформін попереджує збільшення розмірів кардіоміоцитів, зменшує прояви фіброзу та пригнічує секрецію мозкового натрійуретичного пептиду.

4. **Де впроваджено:** кафедра фармакології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова.

5. **Форма впровадження:** науково-педагогічний процес. протокол № 4 від 3/2 2019 р.

6. **Результати впровадження:** використання результатів роботи Лой Г.Я. у навчальному процесі дозволяє поглибити знання студентів про фармакодинамічні ефекти протидіабетичного лікарського засобу метформін

7. **Термін впровадження:** 2019/2020 навчальний рік.

8. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:

Зав. кафедри фармакології
 д.мед.н., професор

Н. І. Волощук

ДОДАТОК В.5

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з наукової та лікувальної роботи
Державного закладу «Дніпропетровська медична
академія Міністерства охорони здоров'я України»



професор

Мамчур В.Й.

2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи в науково-педагогічний процес

1. **Назва пропозиції до впровадження:** Механізми кардіопротективної дії протидіабетичного препарату метформін.

2. **Заклад, де проведена розробка, адреса, ПІБ авторів:** Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра фармакології із клінічною фармакологією, Лой Г.Я.

3. **Джерела інформації:**

- Лой Г.Я, Олещук ОМ, Корда ММ. Вплив метформіну на експресію α -та β -МНС генів після інфаркту міокарда у мишей. Вісник наукових досліджень. 2019(2):90-4.;

- Loi H, Boal F, Tronchere H, Cinato M, Kramar S, Oleshchuk O, Korda M and Kunduzova O. Metformin protects the heart against hypertrophic and apoptotic remodeling after myocardial infarction. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10:154;

- Пасечко НВ, Лой Г.Я, Корда ММ, Олещук ОМ. Роль експресії гена Foxo1 у механізмі антигіпертрофічної дії метформіну в кардіоміоцитах. Міжнародний ендокринологічний журнал. 2018(14,№ 7):705-11.

4. **Де впроваджено:** кафедра фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська державна медична академія Міністерства охорони здоров'я України».

5. **Форма впровадження:** науково-дослідна і науково-педагогічна та педагогічна робота кафедри фармакології і клінічної фармакології ДЗ «ДМА».

6. **Результати впровадження:** застосування результатів наукових досліджень дозволить розширити знання щодо органопротективних властивостей метформіну, зокрема - кардіопротективних.

7. **Результати впровадження:** використання результатів роботи Лой Г.Я. у навчальному процесі дозволяє поглибити знання студентів про фармакодинамічні ефекти протидіабетичного лікарського засобу метформін

8. **Термін впровадження:** 2019/2020 навчальний рік.

9. **Зауваження та пропозиції:** немає.

10. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології та клінічної фармакології ДЗ «ДМА», протокол № 4 від 18 листопада 2019 р.

Відповідальний за впровадження:

Зав. кафедри фармакології
і клінічної фармакології
д.мед.н., професор

В. І. Жилюк

ДОДАТОК Г

Порядок прямого і зворотного праймерів для досліджуваних генів

| Ген | Прямий праймер | Зворотний праймер |
|----------------|-------------------------|-----------------------------|
| GAPDH | CTTTGTCAAGCTCATTTCTGG | TCTTGCTCAGTGTCCTTGC |
| BNP | GCACAAGATAGACCGGATCG | CCCAGGCAGAGTCAGAAAC |
| β -MHC | AGGTGGCTCCGAGAAAGGAA | TGAGCCTTGGATTCTCAAACGT |
| α -MHC | CCACTTCTCCTTGGTCCACTATG | ACAAACCCACCACCGTCTCA |
| Caspase 3 | GAGCTTGGAACGGTACGCTA | CCGTACCAGAGCGAGATGAC |
| Bax | CGGCGAATTGGAGATGAACT | GTCCACGTCAGCAATCATCCT |
| Bcl-2, | TCCCGATTCATTGCAAGTTGTA | GCAACCACACCATCGATCTTC |
| IL-6 | GCCCACCAAGAACGATAGTCA | CAAGAAGGCAACTGGATGGAA |
| TNF- α | TGGGACAGTGACCTGGACTGT | TTCGGAAAGCCCATTTGAGT |
| MCP1 | GCAGTTAACGCCCCACTCA | CCAGCCTACTCATTGGGATCA |
| CD68 | AAAGGCCGTTACTCTCCTGC | ACTCGGGCTCTGATGTAGGT |
| COL1A1 | TGTGTGCGATGACGTGCAAT | GGGTCCCTCGACTCCTACA |
| COL3A1 | AAGGCGAATTCAAGGCTGAA | TGTGTTTAGTACAGCCATCCTCTAGAA |
| TGF- β 1 | GAGCCCGAAGCGGACTACTA | CACTGCTTCCCGAATGTCTGA |
| α SMA | GTCCCAGACATCAGGGAGTAA | TCGGATACTTCAGCGTCAGGA |
| FOXO 1 | CTACGAGTGGATGGTGAAGAG | TGTGAAGGGACAGATTGTGG |

ДОДАТОК Д

Об'єми води та розчинів стандартів приготування серій стандартних розведень

| Ступінь розведення | Основа | Об'єм основи (мкл) | Об'єм розчинника (мкл) | Загальний об'єм (мкл) | Стандартна концентрація (нг/мкл) |
|--------------------|--------------|--------------------|------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| 1 (200) | сток | 5.0 | 5.0 | 10,0 | 100,0 |
| 2 (20) | розведення 1 | 1.0 | 9.0 | 10,0 | 10,0 |
| 3 (2) | розведення 2 | 1.0 | 9.0 | 10,0 | 1.0 |
| 4 (0.2) | розведення 3 | 1.0 | 9.0 | 10,0 | 0.1 |
| 5 (0,02) | розведення 4 | 1.0 | 9.0 | 10,0 | 0,01 |

ДОДАТОК Е

Об'єми реагентів для приготування реакційної суміші для кожного досліджуваного зразка та GAPDH

| Компонент | Об'єм (мкл) на 1 реакцію |
|-------------------|--------------------------|
| Master Mix (2.0X) | 10,0 |
| Assay Mix (20,0X) | 1.0 |
| H ₂ O | 7.0 |
| Загальний об'єм | 18.0 |