

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

КОЗЛОВСЬКА МАРІЯ ГЕННАДІЇВНА

УДК 616.127:576.311.347:577.121:577.25:612.273.2

ДИСЕРТАЦІЯ

**МІТОХОНДРІАЛЬНІ МЕХАНІЗМИ КАРДІОПРОТЕКЦІЇ ПРИ
ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ТА ГІПОКСИЧНОМУ
ПРЕКОНДИЦІЮВАННІ**

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

_____ Козловська М.Г.

Науковий керівник: Портниченко Алла Георгіївна, доктор медичних наук, завідувач відділу гіпоксії

Київ - 2025

АНОТАЦІЯ

Козловська М.Г. Мітохондріальні механізми кардіопротекції при інсулінорезистентності та гіпоксичному прекондиціюванні.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина» – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2025.

Дисертація присвячена встановленню мітохондріальних механізмів кардіопротекції у щурів при інсулінорезистентності і впливі гіпоксичного прекондиціювання.

В експериментах на 72 дорослих щурах самців лінії Вістар з використанням патофізіологічних (моделювання інсулінорезистентності у щурів, гіпоксичне прекондиціювання, ішемія-реперфузія ізольованого серця за методом Лангендорфа), фізіологічних (дослідження функції ізольованих мітохондрій полярографічним методом Чанса), біохімічних (зміни вуглеводного та ліпідного метаболізму, інсулінотолерантний тест, активність про- та антиоксидантних ферментів, морфометричних (визначення розміру інфаркту міокарда), морфологічних (електронна мікроскопія), молекулярно-біологічних (визначення рівня експресія білка коактиватора 1α рецептора, активованого проліфератором пероксисом гама (PGC- 1α) в міокарді методом імуноблотингу), статистичних методів дослідження встановлено мітохондріальні механізми кардіопротекції у щурів при інсулінорезистентності і впливі гіпоксичного прекондиціювання.

Одержані при виконанні роботи результати характеризуються науковою новизною. Вперше встановлено, що розвиток інсулінорезистентності після вживання високожирової дієти протягом 2 тижнів супроводжується перебудовою окиснення енергетичних субстратів у мітохондріях в бік погіршення окиснення НАД-залежного субстрату глутамату і ФАД-залежного сукцинату, в той час як окиснення НАД-залежного ліпідного субстрату пальмітоїлу демонструвало тенденцію до зростання. Одержані показники свідчать про зростання використання ліпідів мітохондріями як енергетичного субстрату, що

супроводжувалося ефективною елімінацією нутритивних тригліцеридів з периферичної крові. У міокарді відбувалася помірна активація вільнорадикальних процесів зі зростанням активованих продуктів тіобарбітурової кислоти на 17%, а в якості основної компенсаторної ланки антиоксидантного захисту була задіяна система глутатіону. В міокарді зростала експресія мітохондріального регулятора PGC-1 α , спостерігалось кількісне зростання субсарколемальної та інтраміофібрилярної субпопуляції мітохондрій та активація їх внутріклітинних зв'язків з іншими органелами.

Вперше охарактеризовано кардіпротекторні прояви активації мітохондріальних механізмів в інсулінорезистентному міокарді, а саме, постішемичне покращення скоротливої функції серця, обмеження проявів окисного стресу, пошкодження мітохондрій та проявів їх дисфункції.

Вперше встановлено, що викликаний інсулінорезистентністю розлад механізмів енергетичного метаболізму призводив до зростання чутливості мітохондрій до впливу гіпоксичного прекондиціонування, проявів мітохондріальної дисфункції і зниження внеску окисного фосфорилування у синтезі аденозинтрифосфату. В цих умовах гіпоксичне прекондиціонування залучало у міокарді додаткові протективні механізми, зокрема, мітохондріальні. У комплексі I електронтранспортного ланцюга відбувалася субстратна перебудова в бік окиснення ліпідів, збільшувалось спряження окиснення і фосфорилування, а також відбувалася активація гліколізу. Гіпоксичне прекондиціонування інсулінорезистентних тварин відзначалося активацією мітохондріального апарату міокарду та енергетичного метаболізму, відсутністю мітохондріальної та ендотеліальної дисфункції. Стимулювалося зростання експресії білка PGC-1 α у правому шлуночку, що може вказувати на більшу напруженість енергетичного метаболізму і підключення додаткових механізмів кардіпротекції. Активізувалася мітохондріальна динаміка в міокарді з елімінацією ушкоджених органел шляхом мітофагії і біогенезом нових мітохондрій. Однак гіпоксичне прекондиціонування при інсулінорезистентності підтримувало тільки структурну протекцію в міокарді при ішемії-реперфузії, тоді як функціональна та метаболічна

протекція зберігалася лише частково через зменшення ефективності мітохондріального дихання при інсулінорезистентності.

Вперше встановлено, що активація опосередкованих PGC-1 α компенсаторних механізмів, а саме, стимуляції мітохондріального біогенезу, переходу мітохондрій на вживання інших енергетичних субстратів, обмеження окисного стресу, забезпечувалася при інсулінорезистентності та впливі гіпоксії зростанням експресії цього білка у міокарді, яка переважала у правому шлуночку серця, а також збільшенням вмісту активатора PGC-1 α ліпопротеїнів високої щільності у периферичній крові.

Одержані результати мають фундаментальне і практичне значення. Встановлено нові відомості про мітохондріальні компенсаторні механізми при інсулінорезистентності, які сприяють відновленню вуглеводного і ліпідного метаболізму в міокарді, посиленню мітохондріального апарату серця і енергетичного забезпечення його функції, що обмежує розвиток окисного стресу та ішемічно-реперфузійне пошкодження міокарда. Встановлено нові відомості про механізми розвитку прекодиціювання міокарда в умовах інсулінорезистентності, а саме, залучення PGC-1 α -залежних мітохондріальних механізмів до структурної протекції міокарду та втрату функціональної протекції за рахунок обмеження енергетичного метаболізму мітохондрій.

Результати роботи можуть бути використані у клінічній медицині – кардіології та кардіохірургії – з метою уточнення рекомендацій щодо застосування методів прекодиціювання та гіпокситерапії у хворих з метаболічними порушеннями, а також у наукових та освітніх закладах медичного профілю.

Ключові слова: серце, інсулінорезистентність, метаболічний синдром, високожирова дієта, гіпоксія, прекодиціювання, ішемія, реперфузія, кардіопротекція, мітохондрії, мітохондріальна дисфункція, окисний стрес, морфологічні зміни, PGC-1 α , щури.

ANNOTATION

Kozłowska M.G. Mitochondrial mechanisms of cardioprotection in insulin resistance and hypoxic preconditioning.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 22 "Health Care" in the specialty 222 "Medicine". – Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, 2025.

The dissertation is devoted to the establishment of mitochondrial mechanisms of cardioprotection in insulin resistance and the effect of hypoxic preconditioning on rats.

In experiments on 72 adult male Wistar rats using pathophysiological (modeling of insulin resistance in rats, hypoxic preconditioning, ischemia-reperfusion of the isolated heart according to the Langendorff method), physiological (study of the function of isolated mitochondria using the Chance polarographic method), biochemical (changes in carbohydrate and lipid metabolism, insulin tolerance test, activity of pro- and antioxidant enzymes, morphometric (determination of the size of myocardial infarction), morphological (electron microscopy), molecular biological (determination of the level of expression of the coactivator 1 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PGC-1 α) protein in the myocardium by immunoblotting), and statistical research methods, mitochondrial mechanisms of cardioprotection in rats with insulin resistance and the influence of hypoxic preconditioning were established.

The results obtained during the work are characterized by scientific novelty. It was established for the first time that the development of insulin resistance after the use of high-fat diet for 2 weeks is accompanied by a restructuring of the oxidation of energy substrates in mitochondria towards the deterioration of the oxidation of the NAD-dependent substrate glutamate and FAD-dependent succinate, while the oxidation of the NAD-dependent lipid substrate palmitoyl showed a tendency to increase. The obtained indicators indicate an increase in the use of lipids by mitochondria as an energy substrate, which was accompanied by the effective elimination of nutritional triglycerides from the peripheral blood. In the myocardium, there was a moderate activation of free radical processes with an increase in activated products of

thiobarbituric acid by 17%, and the glutathione system was involved as the main compensatory link of antioxidant protection. In the myocardium, the expression of the mitochondrial regulator PGC-1 α increased, a quantitative increase in the subsarcolemmal and intramyofibrillar subpopulations of mitochondria and activation of their intracellular connections with other organelles was observed.

For the first time, cardioprotective manifestations of activation of mitochondrial mechanisms in insulin-resistant myocardium were characterized, namely, postischemic improvement of cardiac contractile function, limitation of manifestations of oxidative stress, damage to mitochondria and manifestations of their dysfunction.

For the first time, it was established that the disorder of energy metabolism mechanisms caused by insulin resistance led to an increase in the sensitivity of mitochondria to the effects of hypoxic preconditioning, manifestations of mitochondrial dysfunction and a decrease in the contribution of oxidative phosphorylation to the synthesis of adenosine triphosphate. Under these conditions, hypoxic preconditioning involved additional protective mechanisms in the myocardium, in particular, mitochondrial ones. In complex I of the electron transport chain, substrate rearrangement towards lipid oxidation occurred, the coupling of oxidation and phosphorylation increased, and glycolysis was activated. Hypoxic preconditioning of insulin-resistant animals was marked by activation of the myocardial mitochondrial apparatus and energy metabolism, the absence of mitochondrial and endothelial dysfunction. An increase in PGC-1 α protein expression was stimulated in the right ventricle, which may indicate a greater intensity of energy metabolism and the connection of additional cardioprotection mechanisms. Mitochondrial dynamics in the myocardium were activated with the elimination of damaged organelles by mitophagy and the biogenesis of new mitochondria. However, hypoxic preconditioning in insulin resistance maintained only structural protection in the myocardium during ischemia-reperfusion, while functional and metabolic protection was preserved only partially due to a decrease in the efficiency of mitochondrial respiration in insulin resistance.

It was first established that the activation of PGC-1 α -mediated compensatory mechanisms, namely, stimulation of mitochondrial biogenesis, the transition of

mitochondria to the use of other energy substrates, and the limitation of oxidative stress, was ensured in insulin resistance and the influence of hypoxia by an increase in the expression of this protein in the myocardium, which prevailed in the right ventricle of the heart, as well as by an increase in the content of the PGC-1 α activator high-density lipoproteins in peripheral blood.

The results obtained are of fundamental and practical importance. New information has been established about mitochondrial compensatory mechanisms in insulin resistance, which contribute to the restoration of carbohydrate and lipid metabolism in the myocardium, strengthening the mitochondrial apparatus of the heart and energy supply of its function, which limits the development of oxidative stress and ischemic-reperfusion injury of the myocardium. New information has been established about the mechanisms of myocardial preconditioning development in conditions of insulin resistance, namely, the involvement of PGC-1 α -dependent mitochondrial mechanisms in the structural protection of the myocardium and the loss of functional protection due to the limitation of mitochondrial energy metabolism.

The results of the work can be used in clinical medicine - cardiology and cardiac surgery - in order to clarify recommendations for the use of preconditioning methods and hypoxia therapy in patients with metabolic violations, as well as in scientific and educational institutions of the medical profile.

Keywords: heart, insulin resistance, metabolic syndrome, high-fat diet, hypoxia, preconditioning, ischemia, reperfusion, cardioprotection, mitochondria, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, morphological changes, PGC-1 α , rats.

Список публікацій здобувача:

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Козловська М.Г., Василенко М.І., Гончар О.О., Розова К.В., Портниченко А.Г.** Активація мітохондріальних механізмів кардіопротекції при ішемії-реперфузії ізольованого серця щурів з інсулінорезистентністю. *Фізіологічний журнал*. 2025, 71(1): 71-78. doi: 10.15407/fz71.01.071. (Scopus)

2. Zavorodnii M.O., Nosar V.I., Tsapenko P.K., **Kozlovska M.G.**, Gonchar O.O., Vasylenko M.I., Portnichenko V.I., Portnychenko A.G. Blockade of L-type calcium channels alters hepatic mitochondrial function in insulin-resistant rats. *Fiziologichnyi Zhurnal*. 2023, 69(6): 88-96. doi: 10.15407/fz69.06.088. (Scopus)
3. Алієв Р.Б., Розова К.В., **Козловська М.Г.**, Василенко М.І., Дубова М.Г., Шаповалова А.С., Портниченко А.Г. Морфологічні передумови метаболічних порушень при коморбідному перебігу запального процесу в легенях та цукрового діабету 2 типу у щурів. Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. 2023, 4: 54-64. doi: 10.30978/TB2023-4-54. (Scopus)
4. Portnychenko A.G., Vasylenko M.I., Aliiev R.B., **Kozlovska M.G.**, Zavorodnii M.O., Tsapenko P.K., Rozova K.V., Portnichenko V.I. The prerequisites for the development of type 2 diabetes or prediabetes in rats fed a high-fat diet. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 2023, 14(1):8–14. doi: 10.15421/022303. (Scopus , Web of Science)
5. Цапенко П.К., Василенко М.І., Алієв Р.Б., Завгородній М.О., **Козловська М.Г.**, Топчанюк Л.Я., Сидоренко А.М., Братусь Л.В., Бакуновський О.М., Портніченко В.І., Портниченко А.Г. Вплив високожирової дієти на розвиток інсулінорезистентності та метаболічного синдрому у щурів. *Укр. журн. мед. біол. спорт*. 2020, 5(3): 441–444. doi: 10.26693/jmbs05.03.441.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. **Kozlovska M.G.**, Zavorodniy M.O., Vasylenko M.I., Rozova K.V., Dubova M.G., Portnychenko A.G. Hypoxic Preconditioning Exerts Cardioprotective Effect in Ischemic Injury Against Insulin Resistance and Myocardial Hypertrophy in Rats. 10th Annual Summit on Cardiovascular, Renal and Glycemic Outcomes - The Virtual CVOT Summit 2024, Munich, Germany, 05-06 Dec 2024. *Diabetes, Metabolism, and the Heart* 2024; 33:22.
7. **Kozlovska M.G.**, Zavorodnyi M.O., Vasylenko M.I., Portnychenko A.G. Hypoxic preconditioning alters the level of PGC-1 expression in myocardium of rats with insulin resistance and myocardial hypertrophy. Тези доповідей Міжнародної

конференції з нейронаук та Наукових читань, присвячених вісцеральній фізіології та патофізіології. 19-21 листопада 2024 р. Фізіологічний журнал. 2024, 5(70), дод.: 47-48. doi: 10.15407/fz70.05S.001 . (Scopus)

8. **Kozlovska M.G.**, Zavhorodniy M.O., Vasylenko M.I., Rozova K.V., Dubova M.G., Nosar V.I., Portnychenko A.G. Hypoxic preconditioning improves the condition of myocardial mitochondria in rats with insulin resistance. Матеріали ІХ Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю: «Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України». Івано-Франківськ, 19-21 вересня 2024 р. - Івано-Франківськ: ІФНМУ, 2024. С. 20-21.

9. **Козловська М.Г.**, Василенко М.І., Портниченко А.Г. Гіпоксичне прекодиціонування зменшує розмір інфаркту міокарда у щурів при високожировій дієті. Науково-практична конференція «Інноваційні підходи в лікуванні та профілактиці ендокринних захворювань». Харків, 4 липня 2024.– Харків: ДУ ШЕП, 2024. С.53-54.

10. **Kozlovska M.G.**, Zavhorodniy M.O., Vasylenko M.I., Rozova K.V., Dubova M.G., Portnychenko A.G. Hypoxic preconditioning makes a cardioprotective effect on the ultrastructure of the myocardium in ischemic injury and insulin resistance in rats. ХХІІІ–і читання В. В. Підвисоцького: Бюлетень матеріалів наукової конференції (16-17 травня 2024 року). Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2024. С.12-13.

11. **Козловська М.Г.**, Завгородній М.О., Василенко М.І., Розова К.В., Дубова М.Г., Носар В.І., Портниченко А.Г. Гіпоксичне прекодиціонування покращує стан мітохондрій при інсулінорезистентності. Матеріали VI науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації». Харків, 16 травня 2024 р. С. 117-118.

12. **Kozlovska M.G.**, Gonchar O.O., Vasylenko M.I., Tsapenko P.K., Portnychenko A.G. Antioxidant Properties of PGC-1 in Hypoxic Preconditioning and Insulin Resistance. 9th Annual Summit on Cardiovascular, Renal and Glycemic

Outcomes - The Virtual CVOT Summit 2023, Munich, Germany, 30 Nov – 01 Dec 2023. *Diabetes, Metabolism, and the Heart* 2023; 32:27-28.

13. **Козловська М.Г.**, Завгородній М.О., Носар В.І., Цапенко П.К., Василенко М.І., Портниченко А.Г. Гіпоксичне прекондиціонування змінює функцію мітохондрій кардіоміоцитів у щурів з інсулінорезистентністю та гіпертрофією міокарда. VI науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція». Харків, 16 листопада 2023 р. С. 247-248.

14. **Kozlovska M.**, Nosar V., Zavorodnii M., Vasylenko M., Rozova K., Portnychenko A. Hypoxic preconditioning changes the function of myocardial mitochondria in rats with insulin resistance and arterial hypertension. 8th Annual Summit on Cardiovascular, Renal and Glycemic Outcomes - The Virtual CVOT Summit 2022, Munich, Germany, 10-11 Nov 2022. P 31. *Diabetes, Metabolism, and the Heart* 2022; 31:27.

15. **Козловська М.Г.**, Василенко М.І., Портниченко А.Г. Вплив гіпоксичного прекондиціонування на зміни експресії PGC-1 у міокарді щурів при інсулінорезистентності та артеріальній гіпертензії. Матеріали XIII науково-практичної конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм», Тернопіль, 26-28 жовтня 2022 р. С.34-35.

16. Babicheva V., **Kozlovska M.**, Vasylenko M., Portnychenko A. Hypoxic preconditioning effects change in hypertrophied or insulin resistant rat hearts. 6th Congress of the ESC Council on Basic Cardiovascular Science «Frontiers in CardioVascular Biomedicine 2022» (Budapest, Hungary, 29th April – 1st May). *Cardiovascular Research*, Volume 118, Issue Supplement_1, June 2022, cvac066.045, doi: 10.1093/cvr/cvac066.045. (Scopus)

17. **Козловська М.Г.**, Василенко М.І., Гончар О.О., Портниченко А.Г. Особливості антиоксидантного захисту міокарда щурів із інсулінорезистентністю при гіпоксичному прекондиціуванні. Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України: тези доповідей VIII Національного конгресу патофізіологів України з

міжнародною участю (6-8 жовтня 2021 р.). – Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2021. Т.2. С. 115-116.

18. **Козловська М.Г.**, Бабічева В.В., Василенко М.І., Портниченко А.Г. Вплив гіпоксичного прекондиціювання на розмір інфаркту міокарда при інсулінорезистентності та артеріальній гіпертензії. III науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації». Харків, 12 травня 2021 р. С. 92.

19. Бабічева В.В., **Козловська М.Г.**, Василенко М.І., Портниченко А.Г. Антиапоптотичний ефект гіпоксичного прекондиціювання при моделюванні важкої гіпоксії та при інсулінорезистентності. Перші читання, присвячені Д.О. Альперну «Актуальні питання патологічної фізіології»: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції (до 150-річчя кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна). Харків: ХНМУ, 26 березня 2021. С. 35-36.

20. **Козловська М.Г.**, Бабічева В.В., Василенко М.І., Портниченко А.Г. Особливості кардіопротекторних ефектів гіпоксичного прекондиціювання при інсулінорезистентності. II Галицькі читання і XII Науково-практична конференція «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм», присвячена 100-річчю проф. Бергера Е.Н. і 90-річчю проф. Маркової О.О. Тернопіль, 29-30 жовтня 2020 р. С.56.

21. Бабічева В.В., Пономарьова І.В., **Козловська М.Г.**, Василенко М.І., Портниченко А.Г. Гіпоксичне прекондиціювання при патології міокарда та його механізми. Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України: тези доповідей VIII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю (13-15 травня 2020 р.). Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2020. Т.1. С. 32-33.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	15
ВСТУП	17
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ ВІДОМОСТІ ПРО МІТОХОНДРІАЛЬНІ МЕХАНІЗМИ ПАТОЛОГІЇ МІОКАРДУ ПРИ МЕТАБОЛІЧНИХ РОЗЛАДАХ	25
1.1 Епідеміологія кардіометаболічних захворювань	25
1.2 Мітохондрії та їх роль в енергетичному метаболізмі міокарду	26
1.3 Мітохондріальна дисфункція та її роль у розвитку патології серця при метаболічних розладах	33
1.4 Роль PGC-1 α у мітохондріальних механізмах кардіопротекції	40
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	46
2.1 Характеристика експериментальних груп та дизайн експерименту	46
2.2 Моделювання інсулінорезистентності	48
2.3 Тест толерантності до інсуліну і глюкометрія	48
2.4 Гіпоксичне прекодиціювання	48
2.5 Моделювання ішемії-реперфузії ізольованого серця	49
2.6 Визначення функціональної активності мітохондрій	50
2.7 Визначення показників ліпідограми	51
2.8 Визначення показників окисного стресу	52
2.9 Визначення розміру інфаркту міокарда	53
2.10 Визначення рівня експресії білків	53

	13
2.11 Визначення концентрації білка	55
2.12 Електронномікроскопічні та морфометричні дослідження	56
2.13 Статистичний аналіз результатів	56
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	58
3.1 Дослідження мітохондріальних механізмів кардіопротекції при інсулінорезистентності та гіпоксичному прекондиціюванні	58
3.1.1 Метаболічні прояви моделювання інсулінорезистентності у щурів	58
3.1.2 Морфометричні зміни серця у щурів при розвитку інсулінорезистентності	61
3.1.3 Зміни функції мітохондрій при інсулінорезистентності та гіпоксичному прекондиціюванні	62
3.1.4 Вплив інсулінорезистентності та гіпоксичного прекондиціювання на розвиток окисного стресу у міокарді	65
3.1.5 Вплив інсулінорезистентності та гіпоксичного прекондиціювання на рівень експресії білка PGC-1 α у міокарді	68
3.1.6 Зміни ультраструктури міокарда і мітохондріального апарату кардіоміоцитів при інсулінорезистентності та гіпоксичному прекондиціюванні	69
3.2 Дослідження кардіопротективних ефектів при ішемії-реперфузії ізольованого серця та їх мітохондріальних механізмів	76
3.2.1 Функціональна кардіопротекція при інсулінорезистентності та гіпоксичному прекондиціюванні	76
3.2.2 Розмір інфаркту при інсулінорезистентності та гіпоксичному прекондиціюванні	79

	14
3.2.3 Прояви окисного стресу при інсулінорезистентності та гіпоксичному прекондиціюванні	80
3.2.4 Зміни рівня експресії білка PGC-1 α при ішемічно-реперфузійному пошкодженні за умов інсулінорезистентності та гіпоксичного прекондиціювання	83
3.2.5 Ультраструктурні прояви кардіопротекції при ішемії-реперфузії та її мітохондріальні механізми	85
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ	92
ВИСНОВКИ	109
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	112
ДОДАТКИ	131

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

- AGE - кінцеві продукти глікації
- BCAA - амінокислоти з розгалуженим ланцюгом
- dP/dt_{max} - максимальна швидкість зміни тиску в ЛШ
- dP/dt_{min} - мінімальна швидкість зміни тиску в ЛШ
- ECC - збудження-скорочення
- I/R - ішемія-реперфузія
- IRS - субстрат рецептора інсуліну
- PGC-1 α - коактиватор 1 α PPAR γ
- PPAR γ - рецептор, активований проліфератором пероксисом γ
- STZ – стрептозотоцин
- ТГ - тригліцериди
- АДФ – аденіндинуклеотид
- АТФ - аденозинтрифосфат
- АФК - активні форми кисню
- ВММ - внутрішня мітохондріальна мембрана
- ВЖД - високожирова дієта
- Глу – глутатіон
- ГП - гіпоксичне прекодиціювання
- ДАГ - діацилгліцероли
- ДК – дихальний контроль
- ДКМП - діабетична кардіоміопатія
- ЕТЛ - електронтранспортний ланцюг
- ЖК - жирні кислоти
- ІМФ – інтраміофібрилярний
- ІР - інсулінорезистентність
- ЛПВЩ - ліпопротеїди високої щільності
- ЛПДНЩ - н ліпопротеїди дуже низької щільності

ЛПНЩ - ліпопротеїди низької щільності

ЛШ - лівий шлуночок

МЗ - метаболічний синдром

МЗ - метаболічні захворювання

НАД - нікотинаміддинуклеотид

ОС - окисний стрес

ОФ - окисне фосфорилування

ПШ - правий шлуночок

СОД – супероксиддисмутаза

СС - субсарколемальний

ССЗ - серцево-судинні захворювання

СТЛШ – систолічний тиск ЛШ

ТА – тяжкі аритмії

ТрЛШ - тису, що розвивається в ЛШ

ФАД - флавінаденіндинуклеотид

Хол - загальний холестерин

ЦД - цукровий діабет

ЦТК - цикл трикарбонних кислот

ВСТУП

Актуальність

Метаболічні і серцево-судинні захворювання становлять одну з найбільших медичних проблем сьогодення. Глобальна поширеність цукрового діабету (ЦД) серед осіб віком від 20 до 79 років становила 10,5 % у 2021 р. і, за прогнозами, цей показник зросте до 12,2 %, охоплюючи 783,2 мільйона осіб, до 2045 року. Приблизно 1,70 мільйона смертей були пов'язані з діабетом у 2021 році, причому серцево-судинні захворювання (ССЗ) спричиняють приблизно 65% смертності у хворих на ЦД через розвиток кардіоміопатії та серцевої недостатності. Через патогенетичний зв'язок цих патологій з'явився термін «кардіометаболічні захворювання» [1], що підкреслює необхідність дослідження патогенетичних механізмів, раннього виявлення, комплексного лікування та покращення методів профілактики цих взаємопов'язаних патологічних процесів.

Однією з основних патогенетичних ланок ураження серця при метаболічних захворюваннях може бути нестача енергетичного забезпечення міокарду. Мітохондрії відіграють фундаментальну роль у виживанні та функціонуванні кардіоміоцитів і мають вирішальне значення для забезпечення їх високої потреби в енергії [2]. У мітохондріях відбуваються ключові процеси метаболізму клітинної енергії, такі як окисне фосфорилування (ОФ) для синтезу аденозинтрифосфату (АТФ), а також регулюється передача сигналів, диференціація, клітинний цикл, ріст і клітинна смерть [3].

Одним із ключових регуляторів мітохондріальних функцій є коактиватор-1 (PGC-1 α) рецептора, активованого проліфератором пероксисом-гамма (PPAR γ). Окрім своєї добре встановленої ролі в мітохондріальному біогенезі, PGC-1 виконує важливі функції в динамічних властивостях мітохондрій, включаючи злиття, поділ і деградацію, які керують не тільки енергетичним метаболізмом, але й іншими клітинними подіями [4, 5]. PGC-1 α перешкоджає окисному пошкодженню шляхом посилення експресії широкого спектру генів, пов'язаних з

антиоксидантними білками в різних клітинах [6]. PGC-1 α був визнаний важливим регуляторним білком у контролі кількості серцевих мітохондрій і функції у відповідь на енергетичні потреби [7]. Крім того, PGC-1 α здійснює перехресний регуляторний зв'язок між катаболізмом амінокислот, метаболізмом жирних кислот (ЖК) і рівнями глюкози [8].

Дисрегуляція шляху PGC-1 α істотно порушує гомеостаз серцевого метаболізму. Наявні відомості про дисфункцію мітохондрій при метаболічному синдромі та ССЗ, зокрема, діабетичній кардіоміопатії (ДКМП), вказують на необхідність вивчення участі PGC-1 α у розвитку патології міокарда при інсулінорезистентності (ІР), як початковому етапі розвитку метаболічних захворювань, та його можливої участі у кардіопротективних механізмах.

Яскравим прикладом реалізації кардіопротективних механізмів є феномен прекодиціонування міокарда, що активується нелетальним стресом різного походження і робить міокард менш уразливим щодо наступного ураження, зокрема, ішемічного [9, 10]. Одним з перспективних підходів для індукції прекодиціонування є попередньо розроблене у нашому підрозділі гіпоксичне прекодиціонування (ГП) шляхом гіпоксичного впливу на цілісний організм [9]. Однак, мітохондріальні механізми в умовах прекодиціонування різного генезу досі досліджувалися лише фрагментарно на окремих моделях, що може окреслювати значну перспективу щодо встановлення нових аспектів метаболічної кардіопротекції для її практичного застосування.

Підсумовуючи викладене, слід зазначити, що встановлення мітохондріальних механізмів пошкодження і захисту міокарду в умовах ІР і ГП має значну актуальність і потребує дослідження, що обумовило мету і завдання цієї роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Виконання дисертаційної роботи здійснювалося в рамках планових науково-дослідних тем відділу гіпоксії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Механізми розвитку та компенсації гіпоксичних та оксидативних тканинних пошкоджень при нейродегенеративних і метаболічних розладах»

(2017-2019 рр., номер держреєстрації 0116U004474), «Молекулярно-генетичні механізми впливу гіпоксії на перебіг запалення та метаболічних розладів» (2020-2023 рр., номер держреєстрації 0119U103909), а також проекту програми «Науково-дослідні роботи молодих учених НАН України 2023-2024 рр.» на тему «Молекулярні механізми розвитку інсулінорезистентності та перебудови енергетичного обміну при метаболічному синдромі» (керівник – М.Г. Козловська).

Мета роботи: встановлення мітохондріальних механізмів кардіопротекції у щурів при інсулінорезистентності і впливі гіпоксичного прекондиціонування.

Завдання роботи:

1) визначення змін структурного та функціонального стану мітохондрій, оксидативного балансу, рівень експресії білка PGC-1 α у міокарді, показників вуглеводного та ліпідного обміну у щурів при моделюванні інсулінорезистентності;

2) встановлення особливостей змін структурного та функціонального стану мітохондрій, експресії білка PGC-1 α у міокарді при впливі гіпоксичного прекондиціонування на інтактних та інсулінорезистентних тварин;

3) характеристика протективних ефектів гіпоксичного прекондиціонування при ішемії-реперфузії ізольованого серця щурів з інсулінорезистентністю та без неї;

4) встановлення зв'язку змін структурного та функціонального стану мітохондрій, експресії PGC-1 α з розвитком протективних ефектів гіпоксичного прекондиціонування у інтактних та інсулінорезистентних щурів, оцінка участі PGC-1 α в мітохондріальних механізмах кардіопротекції.

Предмет досліджень: механізми кардіопротекції при порушеннях енергетичного та вуглеводного метаболізму.

Об'єкт досліджень: мітохондріальні механізми структурної і метаболічної протекції міокарда при інсулінорезистентності та впливі гострої гіпоксії.

Методи дослідження:

- Патолофізіологічні: моделювання інсулінорезистентності у щурів Wistar, гіпоксичне прекондиціонування, ішемія-реперфузія ізольованого серця за методом Лангендорфа;
- Фізіологічні: дослідження функції ізольованих мітохондрій полярографічним методом Чанса;
- Біохімічні: зміни вуглеводного та ліпідного метаболізму, інсулінотолерантний тест, активність про- та антиоксидантних ферментів, визначення розміру інфаркту;
- Морфологічні: зміни ультраструктури мітохондрій міокардіоцитів (електронна мікроскопія);
- Молекулярно-біологічні: експресія білка PGC-1 α в міокарді (імуноблотинг);
- Статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Одержані при виконанні роботи результати характеризуються науковою новизною. Вперше встановлено, що розвиток інсулінорезистентності після вживання високожирової дієти протягом 2 тижнів супроводжується перебудовою окиснення енергетичних субстратів мітохондріями в бік погіршення окиснення НАД-залежного субстрату глутамату і ФАД-залежного сукцинату, в той час як окиснення НАД-залежного ліпідного субстрату пальмітоїлу демонструвало тенденцію до зростання. Одержані показники свідчать про зростання використання ліпідів мітохондріями як енергетичного субстрату, що супроводжувалося ефективною елімінацією нутритивних тригліцеридів з периферичної крові. У міокарді відбувалася помірна активація вільнорадикальних процесів зі зростанням активованих продуктів тіобарбітурової кислоти на 17%, а в якості основної компенсаторної ланки антиоксидантного захисту була задіяна система глутатіону. В міокарді зростала експресія мітохондріального регулятора PGC-1 α , спостерігалось кількісне зростання субсарколемальної та інтраміофібрилярної субпопуляцій мітохондрій та активація їх внутріклітинних зв'язків з іншими органелами.

Вперше охарактеризовано кардіпротекторні прояви активації мітохондріальних механізмів в інсулінорезистентному міокарді, а саме, постішемичне покращення скоротливої функції серця, обмеження проявів окисного стресу, пошкодження мітохондрій та проявів їх дисфункції.

Вперше встановлено, що викликаний інсулінорезистентністю розлад механізмів енергетичного метаболізму призводив до зростання чутливості мітохондрій до впливу гіпоксичного прекондиціювання, проявів мітохондріальної дисфункції і зниження внеску окисного фосфорилування у синтез аденозинтрифосфату. В цих умовах гіпоксичне прекондиціювання залучало у міокарді додаткові протективні механізми, зокрема, мітохондріальні. У комплексі I електронтранспорного ланцюга відбувалася субстратна перебудова в бік окиснення ліпідів, збільшувалось спряження окиснення і фосфорилування, а також відбувалася активація гліколізу. Гіпоксичне прекондиціювання інсулінорезистентних тварин відзначалося активацією мітохондріального апарату міокарду та енергетичного метаболізму, відсутністю мітохондріальної та ендотеліальної дисфункції. Стимулювалося зростання експресії білка PGC-1 α у правому шлуночку, що може вказувати на більшу напруженість енергетичного метаболізму і підключення додаткових механізмів кардіпротекції. Активізувалася мітохондріальна динаміка в міокарді з елімінацією ушкоджених органел шляхом мітофагії і біогенезом нових мітохондрій. Однак гіпоксичне прекондиціювання при інсулінорезистентності підтримувало тільки структурну кардіпротекцію в міокарді при ішемії-реперфузії, тоді як функціональна та метаболічна кардіпротекція зберігалася лише частково через зменшення ефективності мітохондріального дихання при інсулінорезистентності.

Вперше встановлено, що активація PGC-1 α – опосередкованих компенсаторних механізмів, а саме, стимуляції мітохондріального біогенезу, переходу мітохондрій на вживання інших енергетичних субстратів, обмеження окисного стресу, забезпечувалася при інсулінорезистентності та впливі гіпоксії зростанням експресії цього білка у міокарді, яка переважала у правому шлуночку

серця, а також збільшенням вмісту активатора PGC-1 α ліпопротеїнів високої щільності у периферичній крові.

Практичне значення отриманих результатів. Одержані результати мають фундаментальне і практичне значення. Встановлено нові відомості про мітохондріальні компенсаторні механізми при інсулінорезистентності, які сприяють відновленню вуглеводного і ліпідного метаболізму в міокарді, посиленню мітохондріального апарату серця і енергетичного забезпечення його функції, що обмежує розвиток окисного стресу та ішемічно-реперфузійне пошкодження міокарда. Встановлено нові відомості про механізми розвитку прекодиціювання міокарда в умовах інсулінорезистентності, а саме, залучення PGC-1 α –залежних мітохондріальних механізмів до структурної кардіопротекції та втрату функціональної кардіопротекції за рахунок обмеження енергетичного метаболізму мітохондрій.

Результати роботи можуть бути використані у клінічній медицині – кардіології та кардіохірургії – з метою уточнення рекомендацій щодо застосування методів прекодиціювання та гіпокситерапії у хворих з метаболічними порушеннями, а також у наукових та освітніх закладах медичного профілю.

Особистий внесок здобувача.

Дисертаційна робота є завершеним самостійним дослідженням автора. Автором особисто було виконано розробку основної наукової ідеї та формулювання мети і завдань дослідження за участі наукового керівника, проведено аналіз літературних джерел відповідно до теми дисертації, розробку теоретичних положень роботи. Автором особисто виконано планування і проведення експериментальних досліджень, одержання, обробку і аналіз фактичного матеріалу. Окремі експериментальні методи виконувались за участю наукових співробітників відділу гіпоксії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, які вказані співавторами опублікованих наукових праць. Інтерпретація отриманих результатів та їх узагальнення, формулювання теоретичних та практичних висновків роботи проводилась здобувачем особисто

за участі наукового керівника. Автором особисто виконано написання всіх розділів дисертаційної роботи. При підготовці наукових праць, опублікованих із співавторами, використано огляд літератури, експериментальний матеріал, статистичні дані та теоретичні узагальнення автора.

Апробація результатів дисертації: Основні результати дисертаційної роботи були представлені та обговорювалися таких профільних наукових конференціях, конгресах, пленумах, семінарах:

- 8th, 9th, 10th Annual Summit on Cardiovascular, Renal and Glycemic Outcomes - The Virtual CVOT Summit 2024, (Munich, Germany, 10-11 Nov 2022; 30 Nov – 01 Dec 2023; 05-06 Dec 2024);
- Міжнародна конференція з нейронаук та Наукові читання, присвячені вісцеральній фізіології та патофізіології (Київ, 19-21 листопада 2024 р.);
- VIII, IX Національний конгрес патофізіологів України з міжнародною участю: «Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України» (Одеса, 13-15 травня 2020 р; 6-8 жовтня 2021 р; Івано-Франківськ, 19-21 вересня 2024 р.);
- Науково-практична конференція «Інноваційні підходи в лікуванні та профілактиці ендокринних захворювань» (Харків, 4 липня 2024 р.);
- XXII, XXIII Читання ім. В.В. Підвисоцького (Одеса, 18-19 травня 2023 р.; 16 – 17 травня 2024 р.);
- III, VI науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (Харків, 12 травня 2021 р.; 16 травня 2024 р.);
- VI науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (Харків, 16 листопада 2023 р.);
- Науковий семінар Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (Київ, 6 листопада 2023 р.);

- XIII науково-практична конференція «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 26-28 жовтня 2022 р.);
- 6th Congress of the ESC Council on Basic Cardiovascular Science «Frontiers in CardioVascular Biomedicine 2022» (Budapest, Hungary, 29th April – 1st May);
- World Congress on Acute Heart Failure «Heart Failure 2021 Online Congress» (29 June - 1 July 2021, Online Congress);
- Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання патологічної фізіології» (Харків, 26 березня 2021 р.);
- II Галицькі читання і XII Науково-практична конференція «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 29-30 жовтня 2020 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації було опубліковано 21 друковану роботу: 5 статей у фахових наукових журналах, затверджених МОН України, в тому числі 4 статті, що індексуються наукометричними базами Scopus та Web of Science, і 16 тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 137 сторінках; складається з анотації; змісту; переліку умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів; вступу; огляду літератури; матеріалів і основних методів дослідження; розділу власних досліджень; аналізу й узагальнення результатів дослідження; висновків; списку використаних джерел із 136 найменувань. Дисертація проілюстрована 2 таблицями і 29 рисунками.

РОЗДІЛ 1.

СУЧАСНІ ВІДОМОСТІ ПРО МІТОХОНДРІАЛЬНІ МЕХАНІЗМИ ПАТОЛОГІЇ МІОКАРДУ ПРИ МЕТАБОЛІЧНИХ РОЗЛАДАХ

1. Сучасні відомості про патогенетичні зв'язки патології міокарду і метаболічних розладів

1.1 Епідеміологія кардіометаболічних захворювань

Протягом останніх десятиліть серцево-судинні захворювання (ССЗ) і метаболічні розлади стали глобальними проблемами охорони здоров'я [11, 12, 13], ССЗ є основною причиною інвалідності та передчасної смерті в Європейському регіоні, спричиняючи понад 42,5% усіх смертей щорічно. При цьому ймовірність померти молодим (30–69 років) від ССЗ у Східній Європі майже в п'ять разів вища, ніж у Західній Європі (ВООЗ, 2024) [14]. У 2021 році глобальна поширеність цукрового діабету (ЦД) серед осіб віком від 20 до 79 років становила 10,5 %, і, за прогнозами, цей показник зросте до 12,2 %, охоплюючи 783,2 мільйона осіб до 2045 року. У 2021 році приблизно 1,70 мільйона смертей були пов'язані з діабетом, причому ССЗ спричиняють приблизно 65% смертності у хворих на ЦД через розвиток кардіоміопатії та серцевої недостатності, що підкреслює необхідність дослідження патологічних механізмів, раннього виявлення, комплексного лікування та покращення методів профілактики цих взаємопов'язаних станів.

Діабетична кардіоміопатія (ДКМП) була вперше описана в 1970-х роках. Фремінгемське дослідження визначило ЦД як незалежний фактор ризику кардіоміопатії незалежно від супутніх захворювань, причому у багатьох пацієнтів ДКМП розвивається при добре контрольованому ЦД [15].

ДКМП – це захворювання у осіб із ЦД, при якому розвивається аномальна структура міокарда за відсутності інших серцевих факторів ризику, таких як ішемічна хвороба серця, гіпертонія та значне захворювання клапанів [16, 17]. Це

прогресуючий стан, який спочатку проявляється як гіпертрофія лівого шлуночка (ЛШ) і порушення діастолічної функції, а потім виникає фіброз міокарда з подальшим розвитком серцевої недостатності із систолічною дисфункцією. Поширеність ДКМП становить приблизно 16% у дорослих людей із ЦД 2 типу [18].

Пацієнти, які страждають на інсулінорезистентність (ІР), метаболічний синдром (МС), ожиріння, дисліпидемію мають високий ризик розвитку кардіоміопатії навіть за відсутності ЦД [15]. Точні механізми таких кардіоміопатій досі повністю не вивчені, тому це підкреслює потребу у нагальності з'ясування основних молекулярних механізмів, що зумовлюють ці патологічні стани.

1.2 Мітохондрії та їх роль в енергетичному метаболізмі міокарду

Через постійне робоче навантаження серця його потреби в енергії для оптимальної роботи є величезними [18]. Серце має високий енергетичний запит, споживаючи приблизно 8% загальних витрат аденозинтрифосфату (АТФ) в організмі [19]. Оскільки накопичення високоенергетичного фосфату в кардіоміоциті є мінімальним, достатнім лише для підтримки серцебиття протягом 2–10 секунд [20], тісний зв'язок виробництва АТФ і скорочення міокарда є важливим для нормальної серцевої функції.

Центральним елементом узгодженої функції передачі енергії є багатоцільова органела мітохондрія [21]. Мітохондрії відіграють фундаментальну роль у виживанні та функціонуванні кардіоміоцитів і мають вирішальне значення для забезпечення високої потреби в енергії в міокарді [2]. Мітохондрії займають 20–30% клітинного об'єму кардіоміоцитів, але їх кількість може динамічно збільшуватися в залежності від енергетичної потреби тканин [22, 23]. У мітохондріях відбуваються ключові процеси метаболізму клітинної енергії, такі як окисне фосфорилування (ОФ) для синтезу АТФ, а також регулюється передача сигналів, диференціація, клітинний цикл, ріст і клітинна смерть [24]. Тому

мітохондріальний і клітинний метаболізм тісно пов'язані [3]. Мітохондрії відіграють важливу роль у різних фізіологічних і патологічних процесах, таких як апоптоз, старіння, аутофагія, виробництво активних форм кисню (АФК), гомеостаз внутрішньоклітинного кальцію та метаболізм амінокислот, ліпідів і глюкози [2].

Двомембранна структура мітохондрій сприяє полегшенню їх різноманітних функцій і регулює фізіологію для підтримки клітинного гомеостазу. [25]. Внутрішня мітохондріальна мембрана (ВММ) містить білки окислювально-відновних реакцій електронтранспортного ланцюга (ЕТЛ), АТФ-синтазу та специфічні транспортні білки. Рушійна сила походить або від потенціалу мембрани (наприклад, надходження Ca^{2+} і обмін АТФ/аденозиндинуклеотид (АДФ), або від градієнтів протонів (наприклад, імпорт пірувату та P_i). ВММ особливо важлива для апоптозу, оскільки вона бере участь у вивільненні активаторів каспаз, таких як цитохром *c*, і змінах транспорту електронів. Крім того, ВММ відіграє роль у виробництві АФК, які беруть участь у різних патологіях, включаючи серцево-судинні [25, 26].

Матриця, простір, обмежений ВММ, є місцем, де виробляється АТФ. Він містить концентровану суміш ферментів, спеціальні мітохондріальні рибосоми, тРНК і кілька копій генома мітохондріальної ДНК. Ферменти сприяють окисленню пірувату і жирних кислот (ЖК) і запуску циклу трикарбонових кислот (ЦТК). Відновні еквіваленти нікотинаміддинуклеотиду (НАД) і флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) виробляються всередині матриці через ЦТК, але також виробляються в цитоплазмі шляхом гліколізу. Електрони від НАДН і ФАДН_2 переносяться на кисень, високоенергетичні молекули і протони через ЕТЛ [27].

Серцеві мітохондрії складаються з трьох просторово та морфологічно відмінних субпопуляцій, які називаються субсарколемальні (СС), інтраміофібрилярні (ІМФ) та перинуклеарними мітохондріями і розташовані поруч із плазматичною мембраною, між скорочувальним апаратом або в безпосередній близькості до ядра, відповідно. Ці субпопуляції відрізняються

структурою, біоенергетичними функціями та мітохондріально-залежними сигнальними шляхами. Як наслідок, вони по-різному реагують на фізіологічні стимули, такі як ожиріння, фізичні вправи, окисний стрес (ОС) і апоптоз. ІМФ мітохондрії забезпечують енергію в основному для підтримки скорочення м'язів, тоді як СС мітохондрії забезпечують АТФ для процесів, пов'язаних з мембраною, включаючи трансдукцію сигналу, іонний обмін, транспортування субстрату та його активацію. Крім того, СС мітохондрії вважаються важливими для окислення ЖК, транспорту глюкози та поширення інсулінової сигналізації. Хоча більшість мітохондріальних досліджень, що вивчають вплив діабету на мітохондріальну функцію, проводилися на загальній популяції мітохондрій, нещодавні дані вказують на різну роль окремих субпопуляцій. Так, активність ланцюга транспортування електронів СС мітохондрій була знижена в м'язах пацієнтів із ЦД 2 типу [28].

Мітохондріальна динаміка, мітохондріальний біогенез і мітофагія є важливими компонентами контролю якості мітохондрій [2]. Мітохондріальна динаміка охоплює процеси злиття, поділу, вибіркової деградації та транспорту [29]. Мітохондріальну динаміку можна використовувати для відновлення пошкоджених мітохондрій шляхом обміну матеріалами між пошкодженими та здоровими мітохондріями [2]. Поділ і злиття знаходяться в рівновазі у фізіологічних умовах і підтримують нормальну масу, форму, мережу, біогенез і оборот мітохондрій [29]. Загалом, зміщення балансу в бік поділу зазвичай пов'язаний із шкідливими процесами, а в бік синтезу – з компенсаторними механізмами. Також слід зазначити, що стрес мітохондрій або дефект ОФ сприяють фрагментації мітохондрій [29]. Процес мітофагії особливо важливий для серцево-судинного гомеостазу та захисту міокарда при ССЗ, включаючи інфаркт міокарда, гіпертрофію серця, серцеву недостатність, ішемію-реперфузію (I/R) та ДКМП. Мітофагія має захисний ефект при ДКМП, запобігаючи окисному стресу та зменшуючи апоптоз [2].

Серце дорослої людини виробляє величезну кількість АТФ, необхідної для підтримки скорочувальної функції, з двох основних джерел: мітохондріального

ОФ та гліколізу. Мітохондріальне ОФ зазвичай забезпечує ~95% потреб міокарда в АТФ, а гліколіз забезпечує решту 5%. Більшість кисню, що споживається серцем, використовується для мітохондріального ОФ ЕТЛ, тоді як синтез АТФ, отриманого в результаті гліколізу, не вимагає кисню [16, 17].

Ключовою метаболічною особливістю серця є забезпечення постійно високого рівня АТФ для підтримки його безперервної скорочувальної активності незалежно від наявності субстрату [30]. У стані спокою серце використовує приблизно 15–25% від максимального енергетичного метаболізму [31]. Здорове серце є «метаболічно гнучким» і може легко переключатися між різними енергетичними субстратами для підтримки виробництва АТФ під час переходу від спокою до гострого стресу, такого як фізичне навантаження чи ішемія, або після вичерпання запасів глікогену під час голодування [31].

Здорове серце має високу метаболічну гнучкість, при цьому ЖК є переважним субстратом, який використовується для виробництва АТФ, потім використовуються лактат, глюкоза, кетони, амінокислоти з розгалуженим ланцюгом (BCAA) [20]. Субстрати необхідно постійно отримувати з крові через низьку здатність серця зберігати їх внутрішньоклітинно. Більшість виробництва мітохондріального АТФ, ~40–60%, утворюється в результаті окислення ЖК, а решта утворюється в результаті окислення пірувату (походить від глюкози та лактату), кетонів і амінокислот [20]. Відомо, що внесок ЖК може зростати при споживанні багаті жирами їжі. У разі обмеженого постачання кисню гліколіз посилюється, а окислення ЖК зменшується, щоб зменшити споживання кисню та мінімізувати гіпоксичне пошкодження [20]. Ця метаболічна пластичність порушується при патологічних станах [30].

Існує механізм автоматичного балансу шляхів окислення глюкози та ЖК в енергетичному субстраті, який називається «циклом Рендла», у якому активація ОФ ЖК пригнічує поглинання глюкози, тоді як підвищене використання глюкози пригнічує ОФ ЖК, і інгібування ОФ ЖК компенсаторно збільшує окислення глюкози. Ця регуляція відбувається головним чином через підвищення рівня інсуліну в плазмі та активацію шляху АМПК. Інсулін збільшує поглинання

глюкози та активує шлях РІЗК/АКТ і, нарешті, підвищує скоротливість міокарда. Активація АМРК сприяє як окисненню ЖК, так і глюкози, що збільшує енергію серця. Крім того, АМРК пригнічує процеси, що споживають АТФ, такі як синтез білка [27].

Міокард людини переважно окиснює довголанцюгові ЖК, які зв'язуються з альбуміном та/або вивільняються з тригліцеридів (ТГ), що містяться в ліпопротеїдах дуже низької щільності (ЛПДНЩ) [31]. Хоча окиснення ЖК дає найбільший вихід АТФ з усіх енергетичних субстратів, воно має найвищу потребу в кисні. Як наслідок, ЖК є найменш ефективними енергетичними субстратами міокарда [32]. Однак, β -окиснення довголанцюгових ЖК серед інших субстратів здатне підтримувати найвищі швидкості ОФ в серці під час максимальних навантажень [27].

При зменшенні споживання АТФ або при дисфункції мітохондрії можуть переходити на виробництво супероксиду та інших вільнорадикальних сполук, відповідальних за ОС [33].

Окиснення глюкози є вигіднішим через його більшу метаболічну ефективність (моль утвореного АТФ/моль спожитого кисню). Тому під час стресу серце змінює свій основний субстрат на глюкозу. Серця хворих на ЦД (і ожиріння у меншій мірі) не здатні здійснити цей метаболічний перехід через інгібування механізму окиснення глюкози [24]. Глюкоза може бути джерелом АТФ як за рахунок цитоплазматичного гліколізу, так і за рахунок мітохондріального окислення пірувату, отриманого в результаті гліколізу. Це найефективніший з енергетичних субстратів при гіпоксії [20].

Гіпоксія зменшує ОФ, а енергія значною мірою виробляється шляхом анаеробного гліколізу та утворення лактату як кінцевого продукту. Лактат може бути перетворений назад на піруват і глюкозу в гепатоцитах з використанням кисню, що призводить до негативного балансу АТФ [33]. При високих рівнях глюкози клітини втрачають здатність утилізувати надлишок доступного пірувату, що призводить до клітинної глюкотоксичності, мітофагії та клітинної смерті. Це

свідчить про те, що гомеостаз глюкози має вирішальне значення для належного функціонування мітохондрій і клітин [3].

У серці окиснення пірувату через мітохондріальну НАДН-оксидазу (комплекс I) є обмежуючим кроком, який не може підтримувати функції швидкого споживання АТФ у серці [20].

Хоча окислення ВСАА є лише незначним джерелом виробництва АТФ у серці (<2% виробництва АТФ), ВСАА дійсно відіграють важливу роль у модулюванні сигнальних шляхів у серці, включаючи передачу сигналів інсуліну та mTOR. Зокрема, збільшення системної ВСАА може сприяти розвитку резистентності до інсуліну. Було запропоновано два основні механізми резистентності до інсуліну, спричиненої ВСАА: 1) постійна передача сигналів mTOR (зокрема, через лейцин), що погіршує трансдукцію сигналу інсуліну через субстрати рецептора інсуліну (IRS) і 2) порушення метаболізму ВСАА, що призводить до накопичення метаболітів ВСАА, які надавали токсичну дію [20].

Мітохондрії не лише здійснюють енергетичну функцію, але й створюють мітохондріальний апарат, який активно взаємодіє з іншими органелами [34]. Мітохондрії часто розташовані поблизу джерела субстрату або в ділянках клітини, які потребують АТФ [35, 36]. Описано тісну взаємодію між мітохондріями та ліпідними краплями, які вважають динамічними клітинними органелами. В міокарді ЖК, отримані з тригліцеридів (ТГ), використовуються як джерело енергії, але вони також служать сигнальними молекулами, а також будівельними блоками для мембран і складних ліпідів [36].

Інтраміоцелюлярне накопичення ліпідів у серцевому м'язі часто негативно асоціюється з резистентністю до інсуліну. Але краплі ліпідів не відповідають виключно за порушення чутливості до інсуліну. У спортсменів, які тренуються на витривалість, краплі ліпідів менші та більші в інтраміофібрилярній області волокон типу I, тоді як краплі ліпідів більші в субсарколемальній області волокон типу II в осіб з ЦД 2 типу. Крім того, склад ліпідів відіграє певну роль, оскільки ліпотоксичність ацилкарнітинів, діацилгліцеролів (ДАГ) і керамідів сприяє розвитку внутрішньоклітинної резистентності до інсуліну [38].

Функціональні порушення, пов'язані з підвищеним рівнем циркулюючих ліпідів та індукованими ними метаболічними змінами в утилізації ЖК і внутрішньоклітинній передачі сигналів, широко називаються ліпотоксичністю [36]. Під цим поняттям також розуміють шкідливі ефекти накопичення ліпідів у нежирових тканинах, які можуть бути спричинені накопиченням продуктів неповного окислення [1]. Накопичення внутрішньоклітинних ліпідів призводить до мітохондріальної дисфункції, накопичення АФК і токсичних ліпідних метаболітів, таких як кераміди, ДАГ, довголанцюгові ацил-КоА і ацилкарнітини [18, 36].

Клітини захищаються від ліпотоксичності або смертю, або окиснюючи ЖК, або секвеструючи їх у вигляді ТГ у ліпідних краплях [36]. Кераміди можуть активувати проапоптотичні шляхи через підвищену проникність мітохондріальної мембрани, що призводить до підвищення рівня АФК з подальшим апоптозом та резистентністю до інсуліну [38, 39]. Пальмітат може індукувати апоптоз кардіоміоцитів новонароджених щурів через зниження мітохондріального кардіоліпіну. Порушення вмісту кальцію та АФК можуть ініціювати накопичення довголанцюгової ЖК та змінювати мітохондріальні мембрани шляхом зміни фосфоліпідного складу з подальшим вивільненням цитохрому c із мітохондрій і кінцевим апоптозом [1].

Щоб захистити серце від ліпотоксичності, мітохондріальне роз'єднання може працювати як адаптивний механізм. Роз'єднувальні білки (UCP) працюють як експортери аніонів ЖК з мітохондріального матриксу з наступним зниженням ОС. Мітохондріальна тіоестераза 1 може гідролізувати жирний ацил-КоА в мітохондріальному матриксі, що є важливим для підвищення ступенів окиснення [1].

При патології ліпотоксичність може виникнути при накопиченні ТГ, коли або перевищено клітинну ємність депо для їх зберігання, або коли пули ТГ гідролізуються, що призводить до підвищення рівня вільних клітинних ЖК. Таким чином, тривалість і ступінь ліпідного перевантаження можуть визначити, захищена чи пошкоджена клітина. [36].

Мітохондріальна дисфункція та порушення виробництва енергії також спостерігаються при ДКМП. У серцях при ДКМП β -окислення посилюється, але не може адекватно метаболізувати необхідну кількість ЖК. Це призводить до зниження ефективності функціонування кардіоміоцитів і накопичення внутрішньоклітинних ліпідів, що порушує β -окиснення мітохондріальних ЖК і ОФ. Це призводить до мітохондріальної дисфункції, накопичення АФК і токсичних ліпідних метаболітів. Підвищене накопичення АФК і ліпотоксичність погіршує передачу сигналів інсуліну, викликає пошкодження кардіоміоцитів і модифікує структурні білки, що призводить до зниження аутофагії та посилення загибелі клітин [40]. Разом ці ефекти сприяють прогресуючій прозапальній та профібротичній відповіді, сприяючи патологічній гіпертрофії серця та діастолічній дисфункції при ДКМП. Таким чином, порушення метаболізму ЖК у серці може безпосередньо сприяти серцевій дисфункції, що спостерігається при ДКМП [18].

Порушення регуляції окислення ліпідів також може призвести до глюкотоксичності. Встановлено, що гіперглікемія призводить до глікозилювання та зшивання колагену та інших протеїнів позаклітинного матриксу, що призводить до збільшення жорсткості міокарда [27]. Але при початкових стадіях метаболічних розладів, зокрема, ІР і предіабеті, ці процеси недостатньо охарактеризовані.

1.3 Мітохондріальна дисфункція та її роль у розвитку патології серця при метаболічних розладах

Було показано, що серед факторів, що впливають на етіологію метаболічних захворювань (МЗ), таких як предіабет, МС та ЦД, критичну роль відіграє мітохондріальна дисфункція. Важливо з'ясувати мітохондріальні процеси, які призводять до прогресування МЗ від ранніх стадій до найважчих станів [28].

ІР, що визначається як порушення здатності інсуліну стимулювати утилізацію глюкози, є однією із найбільш ранніх змін при МЗ у міокарді [41].

Розвиток серцевої ІР може відбуватися незалежно від системної ІР, але остання значною мірою сприяє розвитку серцевої ІР внаслідок підвищення рівня ОС та змін у нейрогуморальному і цитокіновому балансі [42].

При ДКМП виникає гіпертрофія ЛШ, інтерстиціальний фіброз, загибель клітин, діастолічна та систолічна дисфункція, порушення скорочувальної здатності, зміни гомеостазу Ca^{2+} , утилізації субстратів, ліпотоксичність міокарда, збільшення виробництва АФК, і ряд з них є наслідками мітохондріальної дисфункції. Не всі зі згаданих шкідливих змін розвиваються одночасно, і деякі з них є причиною або наслідком інших. Тому для дослідження МЗ критично важливий не лише вибір моделі, але й термін дослідження.

Метаболічний дисбаланс між окисненням ЖК і глюкози є критичним у патогенезі серцевої патології, опосередкованої МЗ. При МЗ дисфункція транспортера глюкози типу 4 (GLUT4) викликає надмірне поглинання мітохондріями ЖК, що посилює утворення АФК до токсичних рівнів і призводить до подальшого пошкодження ОС [19].

Клітинний редокс-баланс є одним із основних посттрансляційних модуляторів активності білків, таких як Ca^{2+} оброблюючі білки, відповідальні за збудження-скорочення (ЕСС). Білки поглинання та вивільнення Ca^{2+} із саркоплазматичного ретикулулу піддаються окиснювальній модуляції. Умови окиснення зазвичай збільшують ймовірність відкриття RyR2 , що може призвести до серцевих аритмій і серцевої недостатності. Зростання глікемії призводить до накопичення кінцевих продуктів глікації (AGE), які можуть порушувати діяльність ферментів і скоротливу функцію серця [30].

Серце отримує більшу частину енергії від окиснення ЖК і перемикається на шлях гліколізу за патологічних станів. При МЗ серце змушене використовувати ЖК майже виключно для генерації АТФ, і це перевантажує мітохондрії та піддає їх ОС та пошкодженню [33]. Навпаки, також було показано, що ЖК можуть регулювати мітохондріальний біогенез шляхом модуляції активності рецептора, що активується проліфератором пероксисом γ (PPAR γ) і PPAR γ -коактиватора 1α (PGC1 α) [20].

Морфологія мітохондрій безпосередньо пов'язана з їх функціями, включаючи виробництво АТФ і АФК. Щоб задовольнити високу потребу в енергії, кардіоміоцити мають більшу кількість мітохондрій порівняно з іншими типами клітин. Мітохондрії ІМФ у дорослому серці щільно ущільнені між саркомерами, але їх морфологія може бути змінена процесом поділу/злиття і тунельним з'єднанням. Хоча процеси поділу/злиття мітохондрій у дорослих кардіоміоцитах нечасті у фізіологічних умовах, це було описано в патологічних ситуаціях, таких як МЗ [18]. Крім того, розподіл мітохондрій змінюється при метаболічному синдромі і предіабеті [28], що впливає на комунікацію саркоплазматичного ретикулуму і мітохондрій, порушуючи мітохондріальний Ca^{2+} і обмін АДФ. Тому не тільки розподіл мітохондрій важливий для забезпечення адекватного руху молекул від і до саркоплазматичного ретикулуму, але також експресія кількох ключових білків, які зв'язують обидві органели та підтримують оптимальну відстань для забезпечення привілейованої передачі сигналу (наприклад, Ca^{2+}) між ними [24].

Оскільки три ферменти (2-оксоглутаратдегідрогеназа, піруватдегідрогеназа та НАД⁺-ізоцитратдегідрогеназа) ЦТК регулюються Ca^{2+} у мітохондріальному матриксі, важливо підтримувати належний Ca^{2+} зв'язок між ними [2]. Багатогранні зміни в мітохондріальному енергетичному метаболізмі, формі, сигналізації Ca^{2+} , зв'язках із саркоплазматичним ретикулумом, генерацією АФК та контролі якості можуть сприяти патогенезу серцевої дисфункції, опосередкованої МЗ [28].

Зміни в споживанні O_2 і швидкості виробництва АТФ при МЗ серця залишаються суперечливими і можуть залежати від ступеня прогресування захворювання. Було продемонстровано, що в стрептозотоциновій моделі щурів зниження споживання O_2 пов'язане зі зниженням виробництва АТФ, або стимулюючи комплекс I з глутаматом/малатом/піруватом або комплекс II з сукцинатом. Автори прийшли до висновку, що серця хворих на ЦД мають загальне пригнічення дихальної здатності та виробництва АТФ зі значним зниженням співвідношення Р/О (виробництво АТФ на спожитий O_2) [1]. У

пацієнтів із ЦД 2 типу споживання O_2 було знижено в станах 3 і 4 у СС мітохондріях або з глутаматом/малатом, або з ЖК/малатом як субстратами, без змін у ІМФ мітохондріях. В експерименті показано зниження швидкості виробництва АТФ у мітохондріях щурів з діабетом [3].

Зміни ОФ мітохондрій також вивчали шляхом вимірювання активності ферментативних комплексів ЕТЛ, активності ферменту ЦТК та протеоміки. Аналіз показав, що деякі основні білки, необхідні для нормальної функції мітохондрій, такі як PGC1 α , ферменти комплексів I, II, III та IV, серед інших, були знижені при МЗ [28, 30].

Однак, в інших літературних джерелах було показано підвищене споживання O_2 в ізольованих мітохондріях мишей db/db у стані 3, коли субстратом був пальмітоіл-карнітин, і не виявили жодних змін при застосуванні пірувату, що свідчить про посилення ОФ ЖК та зниження окиснення глюкози. Збільшене споживання O_2 не призвело до збільшення серцевого викиду, що вказує на неефективність серцевої діяльності та може сприяти скоротливій дисфункції серця при діабеті [28, 30].

У хворих з ЦД2 було показано, що мітохондрії в тканині передсердь демонструють зниження окиснення глутамату і ЖК. Крім того, тканина передсердь пацієнтів з діабетом мала підвищений мітохондріальний викид H_2O_2 і знижений рівень глутатіону (Глу). Ці дані підтверджують роль мітохондріальної дисфункції та ОС в патогенезі ДКМП [18].

Інше дослідження також показує зниження активності комплексів I і IV у мітохондріях, виділених із вушок правого передсердя пацієнтів з діабетом, порівняно з недіабетичними. [2]. Було також виявлено, що серцева тканина пацієнтів із ЦД 2 типу має знижену активність комплексів II і III, а також знижену швидкість ОФ при окисненні ЖК, пірувату або сукцинату. Навпаки, серцева тканина пацієнтів із ожирінням демонструвала менш виражену скорочувальну дисфункцію, ніж при ЦД2, без жодних значних порушень мітохондріальної функції чи ОС [28]. З цих результатів можна зробити висновок, що погіршення скоротливої функції міокарда при переході від ожиріння до ЦД, ймовірно,

пов'язане з розвитком дисфункції мітохондрій [19]. Однак досліджень цих процесів при ІР без наявності ожиріння та ЦД2, що дозволило б оцінити внесок саме ІР у патогенез серцевої патології при МЗ, вкрай недостатньо.

Ряд досліджень показують змінене споживання O_2 при моделюванні МЗ, що свідчить про важливість мітохондріального енергетичного метаболізму в патогенезі серцевої дисфункції, опосередкованої МЗ [2]. Результати, отримані з тканин людського серця [19] були подібні до результатів на тваринних моделях, що підтверджує можливість співставлення їх результатів.

Мітохондріальна динаміка охоплює процеси злиття, поділу, вибіркової деградації та транспорту [28]. Функціональне напруження мітохондрій або дефект ОФ сприяють фрагментації мітохондрій. Процес поділу регулюється декількома білками, включаючи білок 1, пов'язаний з динаміном (DRP1) Fis-1, який з'єднує DRP1 із ЗММ, та інші описані адаптери, такі як MFF, MiD49 та MiD 51 [3, 28].

Злиття мітохондрій контролюється двома основними білками: білком оптичної атрофії (OPA1), розташованим у ВММ, і мітофузином 1 і 2 (Mfn1/2), розташованим у ЗММ. Баланс між злиттям і поділом мітохондрій є важливим для ссавців, і навіть легкі дефекти в динаміці мітохондрій пов'язані з розвитком захворювання. Загалом, зсув балансу в бік поділу зазвичай пов'язаний із шкідливими процесами, а в бік злиття – з компенсаторними механізмами [19, 30].

У дорослому міокарді події поділу складно виявити частково через велику кількість і нерухомість мітохондрій, тому доступні дані щодо мітохондріальної динаміки при опосередкованій МЗ дисфункції серця обмежені. Зображення серцевої тканини за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії показали, що на ранніх стадіях патогенезу серцевого МЗ, наприклад, при предіабеті, спричиненому навантаженням фруктозою, мітохондрії менші та мають більш сферичну форму порівняно з контрольними тваринами, що вказує на те, що можуть відбуватися процеси поділу. Подібним чином було описано зменшення площі, периметра та сферичності мітохондрій у моделі щурів із предіабетом при вживанні високожирової дієти (ВЖД) та введенні стрептозотоцину (STZ) [28]. Проточна цитометрія показала, що розмір мітохондрій і складність крист були

зменшені в діабетичній ІМФ субпопуляції на моделях мишей з діабетом. При цьому щільність серцевих мітохондрій була збільшена, а площа мітохондрій зменшилася, демонструючи незбалансовану мітохондріальну динаміку щодо процесів поділу [24].

Було досліджено роль порушення мітохондріальної динаміки в скоротливій дисфункції міокарда у пацієнтів із ЦД 2 типу без ожиріння [28]. Мітохондрії тканин серця цих пацієнтів не показали різниці в щільності, але були значно зменшені у розмірі. Автори також проаналізували експресію білків, пов'язаних з мітохондріальною динамікою, і виявили значне зниження експресії пов'язаного з мітохондріальним злиттям білка Mfn1, що може пояснити мітохондріальну фрагментацію. Ці зміни в морфології мітохондрій були пов'язані з порушенням активності комплексів I, II і III, зниженням коефіцієнта дихального контролю (ДК) і підвищеним ОС, що додатково підтверджує тісний зв'язок між формою та функцією мітохондрій [30, 33].

Мітохондрія є основною органелою, яка при патологічних процесах бере участь у виробництві АФК – вільнорадикальних (супероксид O_2^- і гідроксильний радикал $\bullet OH$) і нерадикальних (синглетний кисень 1O_2 і перекис водню H_2O_2) окиснювачів [18]. Генерація АФК тісно пов'язана з виробництвом АТФ, споживанням O_2 і передачею сигналів Ca^{2+} у мітохондріях [24].

Кілька захисних механізмів використовуються для полегшення ОС, викликаного надмірним утворенням АФК у клітинах. Система ферментативного захисту включає дію різних антиоксидантних ферментів, таких як супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатіонредуктаза і глутатіонпероксидаза. Іншими неферментативними засобами захисту є антиоксидантні сполуки, які захищають клітини від ОС. Це вітаміни Е і С, Глу, різні каротиноїди та флавоноїди. За нормальних умов надмірне виробництво АФК обмежене в мітохондріях, щоб захистити клітинні органели від окисного пошкодження через ферментативні та неферментативні системи захисту [28]. Коли антиоксидантний захист перевантажений, відбувається перевиробництво

АФК, що призводить до окисного пошкодження білків, ДНК і ліпідів у мітохондріях [20, 28].

У фізіологічних умовах мітохондрії виробляють O_2^- внаслідок окиснення O_2 комплексом I або III, який дисмутує до H_2O_2 залежно від MnСОД. H_2O_2 далі видаляється в мітохондріальному матриксі за допомогою антиоксидантних систем, глутатіонпероксидази та пероксиредоксину. Ці системи поєднуються з виробництвом NADPH. Таким чином, збільшення цитозольних АФК може бути причиною збільшення продукції та/або зниження елімінації [43]. Також було описано процес, названий АФК-індуковане вивільнення АФК, де АФК, що виробляється окремою мітохондрією, може бути передано сусідній мітохондрії, що призводить до ланцюгової реакції, коли багато послідовних мітохондрій виробляють величезну кількість АФК, що викликає подальші пошкодження клітин [28].

На ранніх стадіях МЗ, таких як предіабет і гіперглікемія, морфологічні та функціональні зміни в мітохондріях були пов'язані зі збільшенням ОС. Консос та ін. показали збільшення виробництва H_2O_2 і нітротирозину в ДКМП. Як згадувалося вище, надмірний рух Ca^{2+} від саркоплазматичного ретикулуму до мітохондрій може спричинити перевантаження мітохондрій Ca^{2+} , що призводить до роз'єднання ЕТЛ і надмірного виробництва АФК. Це можна пояснити збільшення виробництва АФК посиленням зв'язком саркоплазматичного ретикулуму і мітохондрій через надекспресію Mfn2 без будь-яких змін в інших білках. У моделі предіабету було виявлено збільшення АФК, а також перекисне окислення ліпідів у гомогенатах серця, що сприяло опосередкованим CaMKII аритміям і апоптозу. Цим ефектам можна запобігти або за допомогою очищення АФК, або за допомогою інгібування CaMKII. Фосфорилування RyR2 за допомогою CaMKII підвищує ймовірність відкритого каналу, що збільшує витік SR Ca^{2+} . Таким чином, запобігання активації RyR2 за допомогою CaMKII дозволяє уникнути не тільки набряку мітохондрій, але й деполаризації мембрани мітохондрій, викликаній предіабетом. Також було виявлено зменшення відстані

між саркоплазматичним ретикулумом і мітохондріями у предіабетичному серці, що додатково посилює АКФ-опосередковану активацію CaMKII [28].

Крім того, на пізніх стадіях МЗ повідомлялося про підвищення АФК, малонового діальдегіду (MDA), а також зміни споживання O_2 , активності MnСОД та/або активності NADPH оксидази. Збільшення генерації мітохондріального супероксиду та інших АФК було описано в моделі STZ-індукованого діабету [43].

Було показано, що тканина передсердь людини з ЦД 2 типу має підвищене виробництво H_2O_2 і знижене співвідношення GSH/GSSG. Модель ob/ob має підвищені MDA та 4-гідроксіалкеналь (обидва продукти окиснення поліненасичених ЖК) у поєднанні зі зниженням PRX-V. Відповідно, інтенсифікація систем поглиначів АФК, таких як надмірна експресія MnСОД, була корисною для запобігання ДКМП [28, 30].

У сукупності дисбаланс АФК є одним із найруйнівніших факторів кардіометаболічних патологій [20].

Наявні відомості підкреслюють необхідність вивчення змін мітохондріального дихання при окисненні різних метаболічних субстратів, мітохондріальної динаміки та проявів ОС як важливих проявів мітохондріальних механізмів патогенезу серцевої патології при МЗ.

1.4 Роль PGC-1 α в мітохондріальних механізмах кардіопротекції

Сімейство коактиваторів-1 (PGC-1) білка, що активується проліфератором пероксисом γ (PPAR γ), складається з трьох членів, включаючи PGC-1 α , PGC-1 β та споріднений з PGC-1 коактиватор (PRC) і було виявлено більше ніж чверть століття тому. Спочатку PGC-1 були визнані основними регуляторами мітохондріальної функції та енергетичного обміну. Вони відіграють значну роль у опосередкуванні ОФ, метаболізму ЖК/ліпідів і детоксикації АФК [4].

Численні дослідження показали, що експресія PGC-1 значною мірою регулюється транскрипційними та посттрансляційними змінами у відповідь на різні зовнішні подразники. Вихідні модулятори, такі як YY1, CREB, Smad, Hes1 і

TORC, регулюють транскрипційну активність і рівні експресії. Крім того, PGC-1 відіграють незамінну роль у різних клітинних процесах шляхом коактивації факторів транскрипції, включаючи PPAR, ERR, NRF, HNF, LXR, FXR, RAR α та GR. Посттрансляційні модифікації білка, включаючи фосфорилювання, деацетилювання і метилювання, ще більше розширюють розміри регуляторної мережі та відіграють критичну роль у транслокації та активації PGC-1 [44].

Як незамінні вузлові регулятори в різноманітних фізіологічних процесах, PGC-1 коактивують експресію багатьох партнерів, як прикладом є PPAR, ERR, NRF, HNF, LXR, FXR, RAR α і GR [45].

Численні дослідження показали, що PGC-1 є основними посередниками в модулюванні мітохондріальних функцій. Коли PGC-1 α активується регуляторами або стресорами, він переноситься з цитоплазми в ядро та посилює експресію NRF. Згодом NRF сприяють транскрипції та експресії TFAM, що додатково посилює транскрипцію та реплікацію мтДНК і синтез білка, що в кінцевому підсумку призводить до генерації нових мітохондрій. І навпаки, мутація PGC-1 α порушує транскрипцію TFAM, що призводить до дисфункціональної реплікації мтДНК. Одночасно активація PGC-1 α стимулює транскрипцію мітохондріальних генів, які беруть участь у комплексах дихальних ланцюгів [46].

Важливо, що окрім своєї добре встановленої ролі в мітохондріальному біогенезі, PGC-1 α також виконує важливі функції в динамічних властивостях мітохондрій, включаючи злиття, поділ і деградацію, які часто керують не тільки енергетичним метаболізмом, але й складними клітинними подіями. PGC-1 α безпосередньо індукує транскрипційну активність промотору Mfn2 і діє синергічно з Mfn2. Втрата Mfn2 зменшує стимулюючу дію PGC-1 α на MMP, що вказує на наявність регуляторного шляху за участю PGC-1 α та Mfn2 [47]. Крім того, надмірна експресія PGC-1 α протидіє зменшенню експресії Mfn1/2 і Opa1. На відміну від цього, експресія Mfn1/2 помітно знижена в м'язах мишей з дефіцитом PGC-1 α/β порівняно з іншими групами, що супроводжується мітохондріальними морфологічними аномаліями, структурними порушеннями та злиттям/поділом і

біогенними дефектами [48]. Нові дані також показали, що PGC-1 α безпосередньо регулює експресію Drp1 шляхом зв'язування з його промотором. Примітно, що посилення регуляції PGC-1 α одночасно збільшує експресію Mfn2 і Opa1, одночасно пригнічуючи експресію Drp1 і поділу 1 (Fis1), таким чином зберігаючи баланс між поділом і злиттям мітохондрій [49].

Різні дослідження виявили роль PGC-1 α в регуляції мітофагії. Надмірна експресія PGC-1 α збільшує ємність лізосом і показники аутофагічного потоку, такі як TFEB, LC3B, Beclin і LAMP1, для підтримки мітохондріального гомеостазу. Крім того, NRF-1 зв'язується з промотором Fundc1 (рецептор мітофагії), таким чином посилюючи мітофагію через його взаємодію з LC3 [50]. PTEN-індукована кіназа 1 (PINK1) і шлях убіквітин-протеїнлігази Parkin RBR E3 є найбільш переважаючим шляхом мітофагії, залежним від убіквітинування. Важливо, що існує взаємний антагонізм між шляхом PINK1/Parkin та PGC-1 α . PINK1 впливає на мітохондріальний біогенез, пригнічуючи експресію білка PGC-1 α та кількість копій мтДНК. У свою чергу, PGC-1 α пригнічує експресію білка PINK1/Parkin та мітофагію [51].

PGC-1 також перешкоджають окисному пошкодженню шляхом посилення експресії широкого спектру генів, пов'язаних з антиоксидантними білками в різних клітинах. При метаболічному стресі PGC-1 α взаємодіє з ERG і коактивує його. Комплекс PGC-1 α -ERG керує експресією антиоксидантних генів, включаючи СОД1 і тіоредоксин (TXN), таким чином гальмуючи АФК-опосередкований апоптоз. Під час дозрівання RPE PGC-1 α посилює експресію антиоксидантних генів, включаючи каталазу, глутатіонпероксидазу 1, пероксиредоксин 3, СОД1, СОД2 і TXN2, і пригнічує опосередковану окислювачем загибель клітин [52].

Проте надмірна експресія PGC-1 α ще більше пригнічує експресію PGC-1 β у RPE. Хоча гіпоксія призводить до значного зниження експресії антиоксидантних генів як при наявності PGC-1 α ^{+/+}, так і при його дефіциті у PGC-1 α ^{-/-}, відновлення антиоксидантних білків при реоксигенації загалом знижується у PGC-1 α ^{-/-}, що вказує на те, що активність PGC-1 α є особливо важливою для підтримки експресії

антиоксидантних генів при реперфузії органів. Навіть втрата єдиного алеля PGC-1 α посилює ОС і загибель клітин, як показано підвищеним співвідношенням GSSG/GSH і вмістом карбонілу [53]. Таким чином, PGC-1 α є потужними регуляторами метаболізму АФК і антиоксидантних ферментів.

Встановлено роль PGC-1 у метаболізмі глюкози, зокрема в регулюванні глюконеогенезу та поглинання глюкози. Іншим значним ефектом PGC-1 є їх роль у модулюванні метаболізму ліпідів. Крім того, PGC-1 α бере участь у метаболізмі амінокислот. PGC-1 α здійснює перехресний регуляторний зв'язок між катаболізмом амінокислот, метаболізмом ЖК і рівнями глюкози [54].

Зв'язок між шляхом PGC-1 і серцево-судинною системою досліджувався з моменту відкриття. Ще в 2000 році Lehman та ін. ідентифікували PGC-1 α як важливу регуляторну молекулу в контролі кількості серцевих мітохондрій і функції у відповідь на енергетичні потреби. Згодом серія досліджень показала, що PGC-1 відіграють незамінну роль у опосередкуванні серцевого транспорту та споживання субстрату, енергетичного стану та розвитку та функціонування серця. Наприклад, експресія PGC-1 α в серці значно збільшується при народженні, що необхідно для високого рівня експресії ядерних і мітохондріальних кодованих генів, залучених до мітохондріальної трансдукції енергії та ОФ, а також для повної дихальної здатності [55].

Отже, дисрегуляція шляху PGC-1 істотно порушує гомеостаз серцевого метаболізму та призводить до різних типів серцевих захворювань і ССЗ.

Недавні дослідження показали, що PGC-1 α та його коактиватори відіграють регуляторну роль у розвитку ДКМП, опосередковуючи метаболізм ліпідів, функцію мітохондрій, антиоксидантний захист та резистентність до інсуліну [56]. Мітохондріальна альдегіддегідрогеназа (ALDH) 2 служить обов'язковою кардіопротекторною молекулою проти кардіоміопатії, викликані резистентністю до інсуліну, яка тісно пов'язана зі стимулюванням SIRT3-залежного деацетилювання PGC-1 α [57]. Фактор транскрипції PR-домен, що містить 16 (PRDM16), є ще одним захисним фактором у ДКМП. Миші зі специфічним серцевим дефіцитом PRDM16 демонструють погіршення серцевої дисфункції,

загострену мітохондріальну дисфункцію, накопичення серцевих ліпідів і апоптоз. Аналіз Co-IP і люциферази підтвердили, що PRDM16 регулює транскрипційну активність, експресію та взаємодію PPAR α і PGC-1 α , тоді як надмірна експресія PPAR α і PGC-1 α усуває спричинену дефіцитом PRDM16 клітинну дисфункцію в моделі ЦД 2 типу. Усе це свідчило про критичні ефекти PPAR α та PGC-1 α на PRDM16-опосередковану кардіопротекторну дію [58].

Наявні відомості про роль PGC-1 у функціонуванні мітохондрій при МЗ та ССЗ, зокрема ДКМП, вказують на необхідність вивчення участі PGC-1 у розвитку патології міокарда при ІР та його можливої участі у кардіопротективних механізмах прекодиціювання міокарда.

Прекодиціювання міокарда - це ендogenous захисний феномен, що активується нелетальним стресом різного походження і робить міокард менш уразливим щодо наступного ураження, зокрема, ішемічного [9, 59]. Прекодиціювання чинить кардіопротекторну дію, за якої в міокарді відбувається генетична активація та фенотипова перебудова.

Пізня (відстрочена) фаза прекодиціювання (24-72 год) спричинена синтезом нових кардіопротекторних білків, що пояснює тривалість цього явища, та захищає як від інфаркту, так і від постішемічної скорочувальної дисфункції, хоча вона менш потужна, ніж рання фаза, щодо обмеження розміру інфаркту. При прекодиціюванні його захисний ефект продовжує зберігатися після закінчення дії фактора прекодиціювання, що може означати існування «пам'яті» прекодиційованого органу. Але після закінчення пізньої фази серце повертається до вихідного стану [60].

Одним з перспективних підходів для індукції прекодиціювання є попередньо розроблене у нашому підрозділі ГП шляхом гіпоксичного впливу на цілісний організм [9, 61], подібні підходи розроблено також на мишах [63].

У цих дослідженнях продемонстровано ряд кардіопротективних ефектів ГП та встановлено деякі молекулярні механізми [62, 64], але в умовах ІР ці механізми можуть змінюватися або втрачати свою активність, що потребує дослідження.

Слід зазначити також, що мітохондріальні механізми в умовах прекодиціювання досі досліджувалися лише фрагментарно на окремих моделях [65]. Відомо, що гіпоксія та пошкодження ЕТЛ впливають на зміни біохімічних і метаболічних процесів у клітинах і спричиняють ремоделювання органел. Порушення кисеньзалежних процесів активує сигнальні шляхи, які призводять до структурних і функціональних змін, залучених до адаптації організму при патологічних станах [66].

Дефіцит кисню стимулює надмірну експресію HIF-1 α та інактивацію PDH через кіназу 1 піруватдегідрогенази, що призводить до переваги анаеробного окислення глюкози. Цей процес, під час якого метаболізм глюкози перепрограмується з аеробного на анаеробний, відомий як ефект Варбурга. Незважаючи на те, що продукція АТФ при анаеробному гліколізі значно нижча (утворюється дві молекули АТФ, а при ОФ - до 36 молекул АТФ), анаеробний гліколіз є кращим через низьке споживання кисню. Оскільки PDH і ЕТЛ мітохондрій є основними джерелами активних форм кисню (АФК), перевага анаеробного гліколізу запобігає апоптозу клітин. Крім того, процес анаеробного гліколізу відбувається в 100 разів швидше, ніж ОФ. Постійна подача невеликої кількості енергії з низьким споживанням кисню є перевагою для негайного забезпечення енергією клітин. Крім того, функція мітохондрій в уражених клітинах значно обмежена; отже, анаеробний гліколіз є основним механізмом виробництва енергії [66]. Отже, в умовах гіпоксії можуть відбуватися значні зміни функції мітохондрій, однак при ГП це не було детально досліджено. Оскільки PGC-1 α може індукуватися при короткотривалій гіпоксії, цей механізм може становити цікавість для вивчення при ГП та ІР в міокарді [67].

Підсумовуючи викладене, слід зазначити, що мітохондріальні механізми пошкодження і захисту міокарду в умовах ІР і ГП потребують дослідження, що обумовило мету і завдання цієї роботи.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика експериментальних груп та дизайн експерименту

Досліди проводили на самцях щурів лінії Вістар загальною кількістю 72 тварин 6-8 місячного віку та масою 300-360 г, які утримувались в стандартних умовах віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Експериментальна робота з тваринами проводилась з дотриманням вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, прийнятої в Страсбурзі 1986 року, чинного законодавства України з питань охорони піддослідних тварин та погоджена Комітетом з біоетики Інституту фізіології Богомольця.

Експериментальних тварин поділяли на наступні групи випадковим чином: 1) «контроль» - інтактні щури (n=16); 2) «ГП» - щури, у яких викликали прекодиціювання за допомогою дії гіпобаричної гіпоксії за добу до відбору зразків (n=16); 3) «ВЖД» - тварини, які вживали ВЖД протягом 14 діб з вільним доступом до питної води (n=20); 4) «ВЖД+ГП» - щури, які перебували на ВЖД 14 діб та в подальшому піддавались ГП (n=20).

Частину із тварин кожної групи використовували для моделювання I/R ізольованого серця через 24 год після впливу ГП.

Відбір зразків для подальших досліджень виконували у наркотизованих тварин шляхом внутріочеревинної ін'єкції уретану («Sigma», США) з розрахунку 1,5 г/кг маси щура та після введення 0,2 мл гепарину («Гепарин-Фармекс», 5000 МО/мл, Україна).

Дизайн експеримента можна представити у вигляді наступної схеми (рис. 2.1):

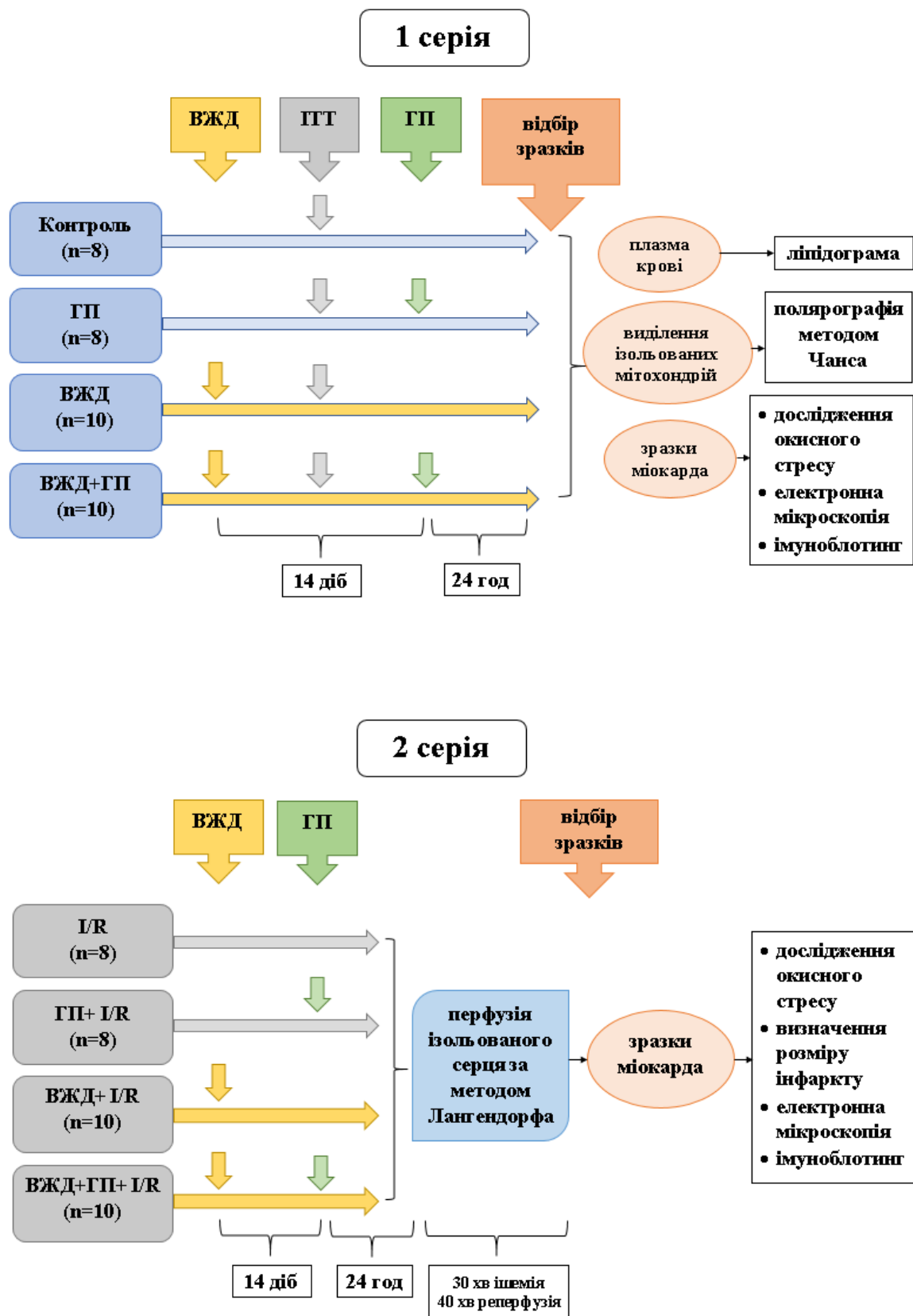


Рис.2.1 Схематичне зображення першої і другої серії досліджень

2.2 Моделювання інсулінорезистентності

ІР викликали вживанням тваринами ВЖД впродовж 14 діб. ВЖД відтворювали за допомогою додавання до стандартного корму віварію (Комбікорм для лабораторних тварин, «Резонівські корма», Україна) домішків жиру (свинячий внутрішній жир) із розрахунку 58% тваринного жиру від загальної калорійності їжі. Щури отримували комбінований корм у вигляді однорідних гранул із подрібнених компонентів без обмежень щодня о 10 год. Кожного наступного дня оцінювали кількість спожитого корму за добу. Доступ до питної води не обмежувався. Розвиток ІР підтверджували, використовуючи тест толерантності до інсуліну [68].

2.3 Тест толерантності до інсуліну і глюкометрія

Тест толерантності до інсуліну проводили за 3 доби до ГП відповідно до методу [69, 70] з власною модифікацією введенням внутріочеревинно рекомбінантного інсуліну людини короткої дії у дозі 0,5 МО/кг («Хумодар», Україна) після 2 год депривації тварин від їжі. Вимірювання концентрації глюкози в периферичній крові з кінчика хвоста щурів здійснювали до та через 15, 30 і 60 хв після введення інсуліну глюкооксидазним методом за допомогою глюкометра («OneTouch Select», LifeScan, США), що відповідає вимогам ISO 15197 та може бути застосовано у цьому дослідженні [71]. ІР вважали відсутність зниження показників глюкози на 15 і 30 хв понад 6,1 ммоль/л або відтермінування реакції на 60 хв.

2.4 Гіпоксичне прекоондиціонування

Для відтворення ГП щурів поміщали у барокамеру та «піднімали» на висоту 5600 м (380 торр) впродовж 3 год [72]. Підвищення та зниження тиску у барокамері здійснювали поступово протягом 20 хв кожен етап для адаптації

тварин, при цьому тривалість «спуску» не враховували у загальний час перебування щурів у барокамері. Для поглинання надлишку діоксиду вуглецю у повітрі, яке видихали тварини, використовували натронне вапно.

2.5 Моделювання ішемії-реперфузії ізольованого серця

I/R ізольованого серця моделювали за допомогою установки для ізовольюмічної перфузії ізольованого серця за методом Лангендорфа (рис. 2.2).

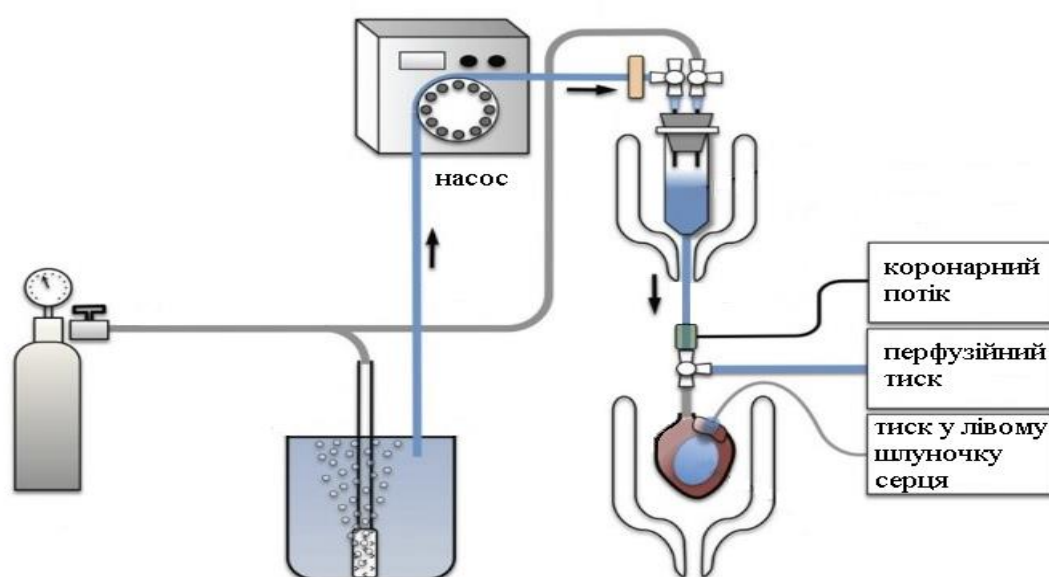


Рис. 2.2 Схема ізовольюмічного ізольованого серця за методом Лангендорфа (creative-bioarray.com, адаптовано)

Для вилучення серця у наркотизованих тварин після розтину грудної порожнини перетинали судинний пучок вище основи серця на 1 см, виділяли серце та поміщали його у льодяний розчин Кребса-Гензеляйта. Після цього протягом 10 сек серце підвішували на аортальну канюлю установки та здійснювали ретроградну ізовольюмічну перфузію за методом Лангендорфа [73, 74] підігрітим до 37°C і насиченим карбогеном (95% O² і 5% CO₂) модифікованим розчином Кребса-Гензеляйта у складі: 14,22 г NaCl; 0,865 г KCl; 5,6 мл 10% CaCl₂; 0,53 г MgSO₄; 0,33 г KH₂PO₄; 3,6 г NaHCO₃ і 4 г глюкози, розчинених у 2 л

дистильованої води, рН=7,4. Для оцінки серцевої діяльності у лівому передсерді за вушком робили розріз, через який спочатку в порожнину передсердя, а потім через мітральний клапан в порожнину ЛШ вводився латексний балончик, з'єднаний з датчиком тиску електроманометра та заповнений достатнім обсягом дистильованої води для створення кінцево-діастолічного тиску на рівні 10 мм рт. ст., та проводили реєстрацію кривої внутрішлуночкового тиску апаратно-програмним комплексом на базі IBM PC [75, 76, 77].

Через 20 хв, коли показники роботи серця стабілізувалися, перфузію припиняли на 30 хв, викликаючи тотальну ішемію, а потім відновлювали постачання розчину і реєстрували показники роботи серця при постішемичній реперфузії протягом 40 хв. Фіксували появу фатальних аритмій (фібриляція шлуночків, повна поперечна блокада, асистолія, важка брадикардія, за яку вважали менше 100 уд/хв).

2.6 Визначення функціональної активності мітохондрій

Для вивчення функціональної активності мітохондрій проводили виділення цих органел з тканини серця щурів. Одразу після наркозу тварини серце швидко виймали з грудної порожнини, розміщували на лід і здійснювали механічну гомогенізацію з додаванням охолодженого до 4⁰С середовища, яке містило: 210 ммоль маннітолу, 70 ммоль сахарози, 4 ммоль ЕДТА, 30 ммоль Tris HCl, 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну, рН=7,4.

Мітохондрії серця виділяли диференційним центрифугуванням за умов, в яких зберігалась їхня нативність.

Процеси дихання та окислювального фосфорилування мітохондрій досліджували полярографічним методом із використанням закритого срібно-платинового електрода Кларка і приладу Оксиграф («Standart Oxygraph System», Hansatech Instruments, Великобританія) з сертифікованим програмним забезпеченням. У полярографічну комірку вносили 1 мл гомогенату тканини серця, додаючи 1 мл середовища інкубації та субстрат окиснення при рН 7,4 і

37°C. За допомогою приладу реєстрували зміни напруження кисню за певний проміжок часу.

Функціональний стан мітохондрій досліджували методом Чанса і Вільямса [78]. Середовище інкубації, охолоджене до 4°C, містило: 0,3 моль сахарози, 3 ммоль NaH_2PO_4 , 10 ммоль Tris HCl , $\text{pH}=7,4$. Як субстрат окиснення використовували: 5 ммоль сукцинату натрію; 5 ммоль глутамату натрію і 2,5 ммоль малату натрію; 5 ммоль пірувату і 2,5 ммоль малату натрію; 40 ммоль пальмітоїлу/DL-карнітину і 2,5 ммоль малату натрію. Дихання стимулювали додаванням 200 мкмоль АДФ.

Використовуючи одержані полярограми обчислювали наступні параметри дихання мітохондрій (за Чансом): швидкість в стані спокою (V_2 , дихання у вихідному стані до стимулювання АДФ), швидкість активного дихання за умов додавання АДФ (V_3 , фосфорильоване дихання), швидкість контрольованого дихання (метаболічний стан 4, $V_4^{\text{АТФ}}$, дихання у стані спокою або після припинення фосфорилування АДФ), що являється показником ефективності регуляції дихання мітохондрій, коефіцієнт дихального контролю (ДК, вираховувався відношенням V_3/V_4) і коефіцієнт ефективності фосфорилування ($\text{АДФ}/0$), який віддзеркалює кількісний зв'язок між споживанням кисню та синтезом АТФ (розраховувався відношенням кількості фосфорильованого АДФ до спожитого кисню при V_3) [78]. Показники споживання кисню представляли у $\text{нмоль O}_2 \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$ [74].

Концентрацію білка визначали методом Лоурі [79].

2.7 Визначення показників ліпідограми

Для оцінки ліпідного обміну досліджували показники ліпідограми у плазмі крові, відібраної при розсіченні аорти і видаленні серця з грудної клітки щурів у гепаринізовані пробірки. Одразу здійснювали центрифугування зразків крові при 4000 об/хв протягом 5 хв, відібрану плазму заморожували. Дослідження концентрації загального холестерину (Хол), ТГ та Хол ліпопротеїдів високої

щільності (ЛПВЩ) проводили набором реактивів (AD1A704, AD1A306, AD1A602) відповідно до протоколів виробника Audit Diagnostics (Великобританія) на основі ензиматичних колориметричних методів [80]. Спектрофотометрію виконували на мікропланшетному фотометрі (HiPo Biosan MMP-96, Латвія) з відображенням отриманих результатів у програмі QuantAssay та виражали у ммоль/л. На основі формули Фрідевальда (окільки концентрація ТГ була меншою 2,3 ммоль/л) розраховувалась концентрація Хол ліпопротеїдів низької (ЛПНЩ) та ЛПДНЩ:

$$\text{ХолЛПНЩ} = \text{Хол} - \text{ХолЛПВЩ} - \text{ТГ} / 2,2 \text{ [ммоль/л]},$$

$$\text{ХолЛПДНЩ} = \text{ТГ} / 2,2 \text{ [ммоль/л]}.$$

2.8 Визначення показників окисного стресу

Для дослідження активації окисних процесів у тканинах серця щурів визначали накопичення вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів, які вступають в реакцію з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активовані продукти – ТБК-АП). Вміст ТБК-АП виражали в нмоль/мг білка [81].

Антиоксидантні системи оцінювали за допомогою спектрофотометричних методів. Кількість відновленого Глу досліджували за участю реактиву Елмана (0,5 мл 5.5'-дитіо-біс-нітробензойної кислоти, розведеної в абсолютному етанолі), до якого додавали гомогенат міокарда та 0.4 М буфер Tris HCL з 2 mM EDTA, pH=8.9 [82].

Метод визначення активності Cu-Zn супероксиддисмутази (СОД) ґрунтується на її здатності гальмувати аутоокиснення адреналіну при pH 10,2. У кювету з 0,15 М карбонатного буферу вносили гомогенат міокарда і запускали реакцію за допомогою 2 М розчину адреналіну. Розрахунки представляли в у. о. За 1 у. о. активності ферменту вважали 50% інгібування реакції [83].

Активність каталази оцінювали за методом, який ґрунтується на властивості солей молібдену вступати в реакцію із пероксидом водню, утворюючи забарвлений комплекс. Результати представляли у мкмоль/хв/мг білка [84].

Концентрацію білка виявляли методом Бредфорда, у якості стандарту використовували бичачий сироватковий альбумін [85].

2.9 Визначення розміру інфаркту міокарда

Після I/R ізольованого серця досліджували розмір інфаркту методом забарвлення трифенілтетразолієм за модифікацією Ан. Попередньо заморожені цілі серця тварин розрізали в горизонтальному напрямку відносно осі на декілька зрізів, які інкубували у 1% розчині хлориду 2,3,5-трифенілтетразолію протягом 30 хв при 37⁰С в термостаті і 20 хв у 10% формаліні також при 37⁰С. Неуражені ділянки серця набували червоного забарвлення, а інфарктні ділянки виглядали незабарвленими (рис. 2.3). Зрізи фотографували та обраховували площу ураження в програмі ImageJ (США) [74].

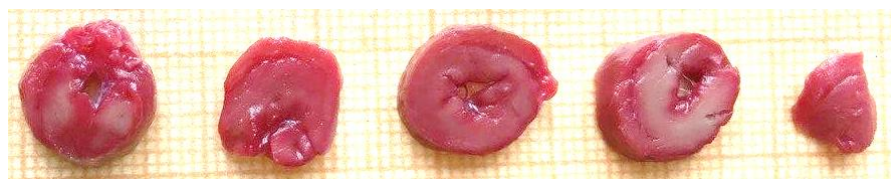


Рис. 2.3 Приклад забарвлення зрізів серця при визначенні розміру інфаркту

2.10 Визначення рівня експресії білків

Рівень експресії білків визначали у тканинах міокарда щурів методом імуноблотингу (Western blotting) відповідно до протоколів BIO-RAD Labs (США).

Зразки тканин серця відбирали в динаміці досліджень після впливу ГП або I/R. У наркотизованих тварин здійснювали розтин грудної порожнини, перерізали аорту і виймали серце. Його одразу поміщали у холодний 0,9% розчин хлориду натрію для відмивання від крові, обсушували фільтрувальним папером, зважували та заморожували в рідкому азоті.

Заморожені зразки міокарда механічно подрібнювали у рідкому азоті, зважували та додавали охолоджений лізис-буфер (Тріс-НСІ 50 ммоль/л, рН=7,5;

ЕДТА та ЕГТА по 0,5 ммоль/л; дітіотреїтол 2 ммоль/л; 10% гліцерол; 0,1% Тритон X-100; PMSF 0,2 ммоль/л та 1% коктейль інгібіторів протеаз) у співвідношенні 1:2. Наступним етапом здійснювали гомогенізацію зразків протягом 1 хв в ультразвуковому гомогенізаторі УЗД-1. Після інкубації при 0°C впродовж 30 хв лізати центрифугували при 12000 об/хв 20 хв за температури 4°C та відбирали по 10 мкл супернатанту для дослідження концентрації білка (згідно протоколів Thermo Fisher Scientific біцинхоніновим методом) та решту для проведення електрофорезу. В останні додавали четверту частину об'єму 4-кратного буферу у складі: Tris-HCl 0,25 моль/л; DTT 0,4 моль/л; 40% гліцерол; 8% SDS; 0,02% бромфеноловий синій та 5% β -меркаптоетанол. Після чого білки у зразках денатурували на киплячій водянній бані 7 хв.

Денатуровані білки розділяли використовуючи метод вертикального гелі-електрофорезу на системі SDS-PAGE і установці MINI PROTEAN-3 («BIO-RAD Labs», США). Для цього у комірки 12% поліакриламідного геля (4,85 мл деіонізованої води; 2,5 мл 30% розчину акриламідну і бісакриламідну у співвідношенні 29:1; 2,5 мл 1,5 моль Tris-HCl з рН 8,8; 0,1 мл 10% SDS; 0,05 мл 10% APS та 5 мкл TEMED) послідовно вносили 5 мкл суміші стандартів молекулярної маси (Chemichrome Western Control, «Sigma», США), досліджувані зразки та буфер для зразків в останню комірку. Гелі поміщали в установку і заливали електрофорезним буфером у складі: 50 ммоль/л Tris, 0,1% SDS та 380 ммоль/л гліцину (Tris/Glycine Buffer, «BIO-RAD Labs», США). Розділення білків здійснювали перші 10 хв у режимі 100 V і збільшували до 200 V доки фронт не досягав нижнього краю геля. З метою перевірки якості електрофорезу гель забарвлювали розчином Кумасі.

Трансфер, тобто перенесення досліджуваних білків на PVDF-мембрани, здійснювали на приладі MINI TRANSBLOT CELL («BIO-RAD Labs», США). Активацію мембран здійснювали у метанолі впродовж 1 хв. Касети з гелем та мембраною, обкладених з двох сторін фільтрами по типу сендвічу, поміщали у танк і заливали трансфер-буфером, що мав аналогічний склад до електродного

буфера. Перенесення відбувалося протягом 1,5 год при 300 мА. Контроль якості трансферу білків оцінювали забарвленням мембрани Понсо-С.

Після цього виконували блокування білків на мембранах впродовж 1 год за допомогою блокуючого розчину Clear Milk Blocking Buffer («ThermoFisher Scientific», США). Мембрани обробляли первинними поліклональними антитілами PPARGC1A («Invitrogen», США, PA5-72948) протягом 16 год, внесеними у блокуючий буфер з додаванням 0,1% Tween-20. Відмивання мембрани проводили у буфері Fast Wash Buffer («ThermoFisher Scientific», США) з додаванням 1% BSA і 0,05% Tween-20 3 рази по 5 хв на шейкері. Далі мембрани інкубували з вторинними антитілами - козячим антикролячим IgG, кон'югованим з пероксидазою («Sigma», США, F0545) - 1 год і відмивали 4 рази по 5 хв на шейкері. Антитіла розводили відповідно до інструкції виробника. Для детекції та імунозв'язування білків використовували набір реактивів ProteoQwest Colorimetric Western Blotting Kit («Sigma», США). Для виявлення комплексу антиген-антитіло мембрану інкубували у 5 мл розчину субстрату Тетраметилбензидину (1-Step Ultra TMB Blotting Solution, «ThermoFisher Scientific», США) до появи синього забарвлення та зупиняли реакцію дистильованою водою. Мембрани сканували, виконували обрахунок інтенсивності забарвлення за допомогою комп'ютерної денситометрії у програмі ImageJ (США) та представляли в у. о., приймаючи контроль за 1 у. о.

2.11 Визначення концентрації білка

Вміст білка досліджували біцинхоніновим методом за допомогою набору реактивів Thermo Fisher Scientific (Великобританія) та протоколу Micro BCA Protein Assay Kit. Метод полягає у використанні біцинхонінової кислоти як реагенту для виявлення Cu^{+1} , який утворюється при відновленні Cu^{+2} під час взаємодії з білком у лужному середовищі. Фіолетовий продукт реакції виникає в результаті хелатування двох молекул бичачого сироваткового альбуміну з одним іоном міді [86].

Розчинні зразки білка, розведені у 20 разів дистильованою водою, вносили по 10 мкл у планшет. Додавали 40 мкл дистильованої води та 50 мкл робочого буферу у відповідності до методики виробника. Як стандарт використовували розчин бичачого сироваткового альбуміну 1 мг/мл, бланком була дистильована вода. Планшет інкубували при 37⁰С 30 хв. Вимірювання оптичної щільності здійснювали на планшетному спектрофотометрі (HiPo Biosan MMP-96, Латвія) після охолодження зразків до кімнатної температури при 562 нм. Концентрацію білка в мг/мл обраховували за наступною формулою:

$$C_{\text{білка}} = (A562_{\text{зразка}} - A562_{\text{бланка}}) * 20 / A562_{\text{стандарта}}$$

2.12 Електронномікроскопічні та морфометричні дослідження

Зразки для морфологічних досліджень відбирали з верхівки ЛШ серця одразу після розкриття грудної клітки тварини та проводили подвійну фіксацію - спочатку у розчинах 2% параформальдегіду, 2,5% глутарового альдегіду в 0,1 М фосфатному буфері з рН 7,4 за загальноприйнятою методикою 3 год, а потім за допомогою охолодженого реактиву Колфілда («Sigma», США) на основі 2% розчину OsO₄ при рН 7,4 2 год. Наступним етапом було зневоднення зразків у спиртах наростаючої концентрації (по 10 хв у 50%, 60%, 70%, 85%; 20 хв у 96% та 30 хв в абсолютному 100% спирті) та ацетоні (100%, 2 рази по 30 хв). Заливку матеріалу проводили у суміші епоксидних смол з ацетоном Epon-Araldit («Fluka», Швейцарія). Полімеризація смоли відбувалася протягом 24 год при 60⁰С. Із зразків отримували ультратонкі зрізи (товщина 40-60 нм), які контрастували за методом Рейнольдса [87] 1% уранілацетатом і 0,4% цитратом свинцю («Sigma», США) і переглядали в електронному мікроскопі ПЕМ-125К (Україна). Морфометрію досліджували на 130-150 полях для кожного впливу, керуючись підходами Вейбеля, за допомогою комп'юторної програми Image Tool 3 Version (США) [88].

На електроннограмах оцінювали загальну кількість, середній діаметр та відсоток структурно змінених мітохондрій окремо СС та ІМФ субпопуляцій [74].

2.13 Статистичний аналіз результатів

Для статистичної обробки отриманих результатів застосовували загальноприйняті методи варіаційної статистики, використовуючи для цього комп'ютерну програму GraphPad Prism (США, версія 8.1.0.325). Для перевірки нормальності розподілу вибірок використовували тести Шапіро-Уїлка та Колмогорова-Смірнова, зважаючи на кількість досліджуваних даних.

При порівнянні двох груп з нормальним розподілом та параметричними даними використовували метод t-критерію Стьюдента, а критерії Манна-Уїтні та Вілкоксона - з непараметричними даними для незв'язаних і зв'язаних величин відповідно. Для оцінки трьох і більше незалежних груп поводити дисперсійний аналіз (ANOVA) і post hoc аналіз з поправкою Тьюкі.

Результати представляли як середнє арифметичне та похибку середнього $M \pm m$. Відносні величини представляли у відсотках. Відмінність вважали статистично значущою при рівні вірогідності помилки $p < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Дослідження мітохондріальних механізмів кардіопротекції при інсулінорезистентності та гіпоксичному прекондиціюванні

3.1.1 Метаболічні прояви моделювання інсулінорезистентності у щурів

У дорослих щурів Wistar IP відтворювали шляхом споживання ВЖД протягом 2 тижнів. Маса тіла дослідних тварин на початку експерименту становила 320 ± 15 г.

Після споживання ВЖД приріст маси тварин був незначний і становив $13,89 \pm 2,96$ г, за той же період у контрольних тварин – $7,14 \pm 3,51$ (рис. 3.1).

Отже, споживання ВЖД протягом 2 тижнів не призводило до вірогідної зміни маси тіла щурів.

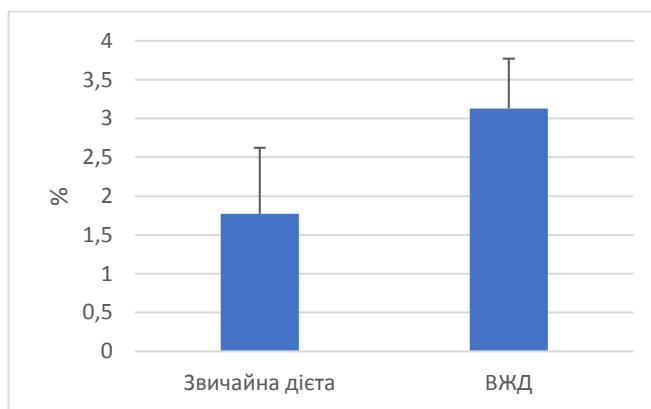


Рис. 3.1 Приріст ваги тварин після споживання ВЖД протягом 2 тижнів, представлений у % від вихідного рівня

Для підтвердження розвитку ІР використовували ІТТ та проводили глюкометрію. При проведенні ІТТ у контрольних щурів відзначалося вірогідне падіння глікемії з 30 хв, яка зберігалася до 60 хв експерименту, що свідчить про наявність чутливості до інсуліну.

Водночас у щурів після споживання ВЖД було виявлено відсутність зменшення показників глюкози протягом 60 хв спостереження від моменту введення інсуліну (рис.3.2), що вказує на порушення чутливості до інсуліну.

Отже, можна зробити підсумок, що ІР розвивається при споживанні ВЖД протягом 2 тижнів, що можна розглядати як ранній етап розвитку ІР.

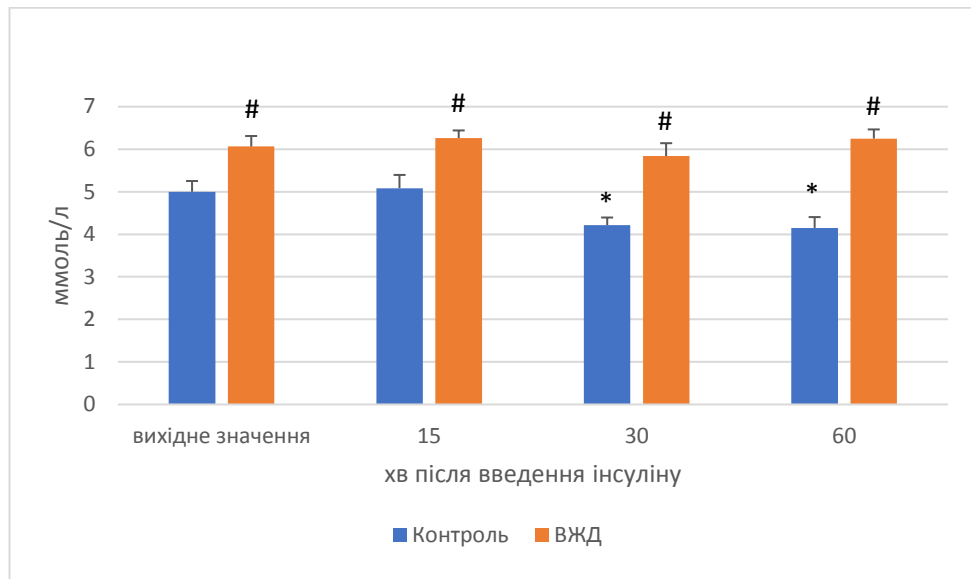


Рис. 3.2 Показники тесту толерантності до інсуліну через 14 днів експерименту (вміст глюкози в периферичній крові) у щурів. * $p < 0,05$ порівняно з вихідним значенням, # $p < 0,05$ порівняно з ВЖД

В процесі проведеного експерименту було виявлено і вірогідне зростання рівня глюкози периферичної крові при ліпідному навантаженні протягом 2 тижнів (рис. 3.2, вихідні значення). У щурів з ВЖД рівень глюкози становив 6,06 ммоль/л (у контрольній групі – 5,0 ммоль/л з $p < 0,05$). Грунтуючись на сучасних критеріях American Diabetes Association [89], показники більше 6,0 ммоль/л можна розцінювати як предіабет.

Отже, згідно з показниками глюкометрії, годування ВЖД призводило лише до граничних величин щодо розвитку предіабету.

Для оцінки метаболічних порушень при споживанні ВЖД досліджували показники ліпидограми. Виявлено, що розвиток ІР при споживанні ВЖД не супроводжувався вірогідним зростанням Хол, але змінювалося співвідношення

його фракцій ХолЛПНЩ та ХолЛПВЩ з вірогідним збільшенням останньої (рис. 3.3).

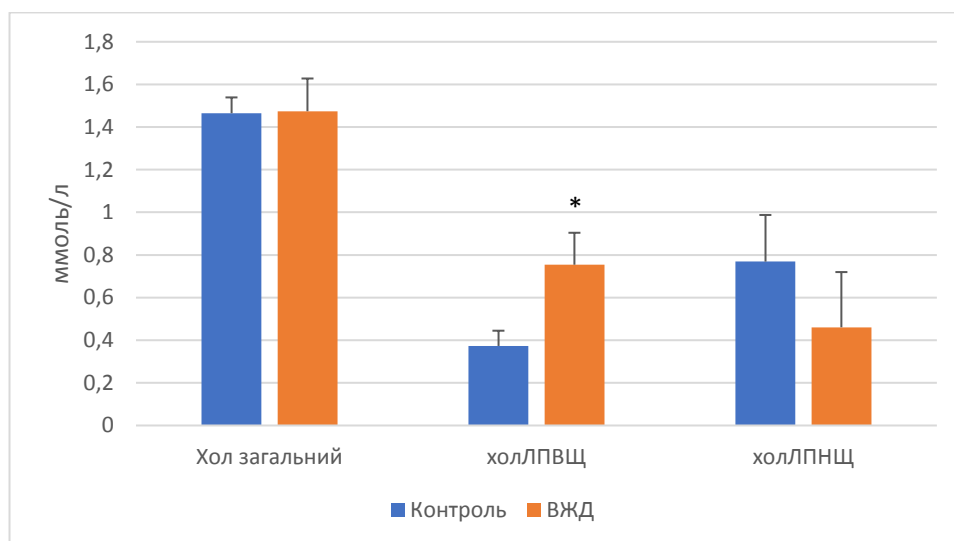


Рис. 3.3 Вміст холестерину та його фракцій (ХолЛПВЩ і ХолЛПНЩ) у крові щурів при споживанні ВЖД. * $p < 0,05$ порівняно з контролем

Інший характер змін виявлявся щодо вмісту ТГ та пов'язаного з ними ХолЛПДНЩ. У тварин не спостерігалось вірогідних змін цих показників при ВЖД, хоча вони мали значну варіабельність (рис. 3.4).

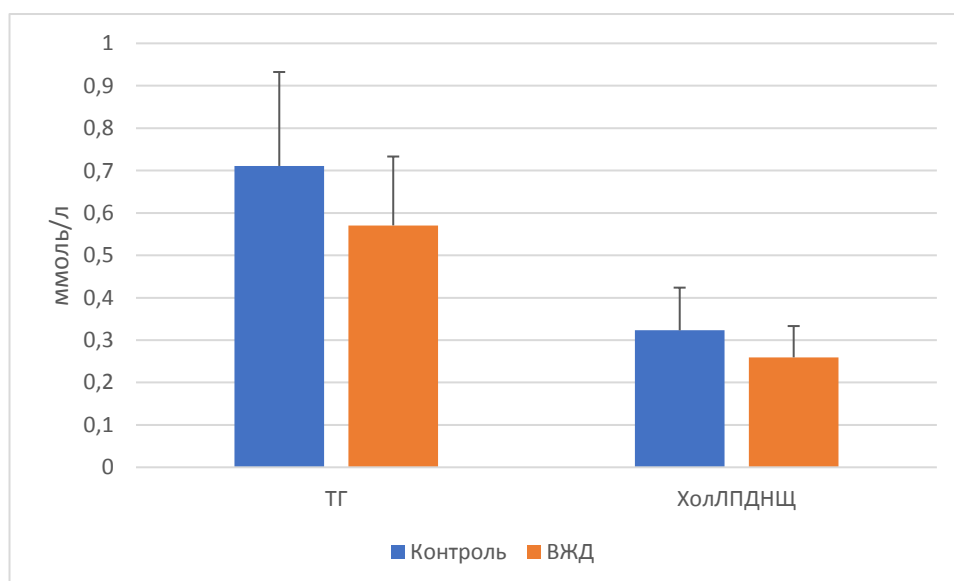


Рис. 3.4 Вміст ТГ та ХолЛПДНЩ у крові щурів при споживанні ВЖД. * $p < 0,05$ порівняно з контролем, # $p < 0,05$ порівняно з ВЖД

На основі ліпідограми можна відзначити, що на тлі споживання ВЖД у щурів відбувалася перебудова ліпідного обміну, яка супроводжувалася підвищенням вмісту антиатерогенного ХолЛПВЩ. Можна також висловити припущення, що відсутність зростання і навіть тенденція до зниження рівня ТГ при ліпідному навантаженні є проявом зростання використання їх мітохондріями в якості субстрата для підтримки енергетичного обміну, тобто компенсаторно-приспосувальним механізмом.

3.1.2 Морфометричні зміни серця у щурів при розвитку інсулінорезистентності

Для виявлення можливого ремоделювання міокарда при розвитку ІР проводили морфометричні дослідження серця. З цією метою обчислювали відносні показники маси серця щурів (за 100% вважали вихідні показники), індекс маси серця, тобто співвідношення маси серця (г) до маси тіла тварини (г) та індекс маси ЛШ - частки маси ЛШ з перегородкою (г) у масі обох шлуночків серця (г).

Встановлено, що споживання ВЖД не призводило до істотних змін маси серця щурів (рис. 3.5, А). Визначення індексу маси серця виявило, що при ВЖД відмічалася тенденція до його зниження (рис. 3.5, Б). Це може свідчити, що зростання маси тіла при ліпідному навантаженні у щурів переважає над зростанням маси серця. Таку ж тенденцію виявлено і при розрахунку індексу маси ЛШ (рис. 3.5, В), що вказує на відсутність його гіпертрофічних змін.

Отже, при дослідженні морфометричних показників виявлено, що вживання ВЖД не чинило суттєвого впливу на збільшення відносної маси серця та індексу маси ЛШ, тобто, не спостерігалось ознак ремоделювання серця або його відділів.

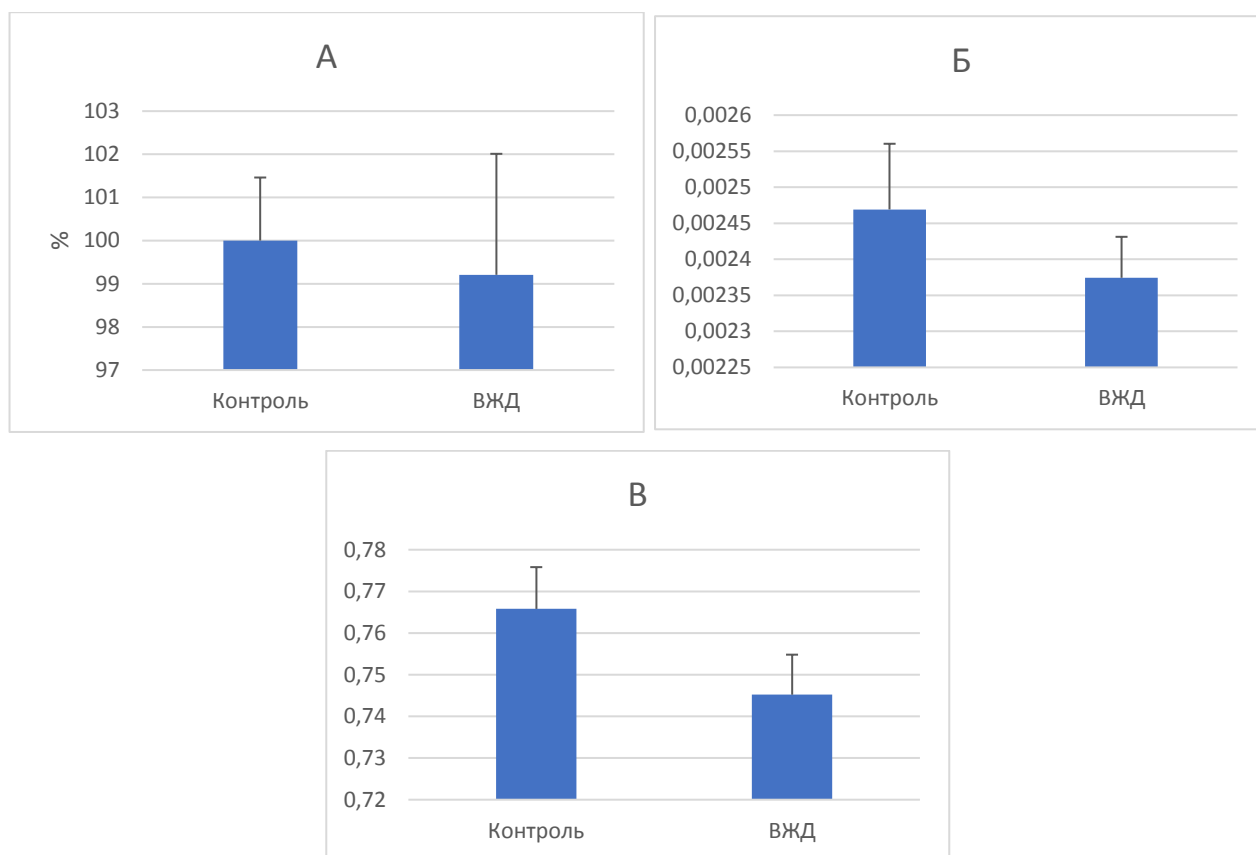


Рис. 3.5 Відносні показники маси серця шурів (А), індекс маси серця (Б) та індекс маси ЛШ (В) при ВЖД

3.1.3 Зміни функції мітохондрій при інсулінорезистентності та гіпоксичному прекодиціюванні

Для дослідження окиснювальної функції мітохондрій кардіоміоцитів проводили полярографічне дослідження методом Чанса .

Встановлено, що в міокарді шурів після перебування на ВЖД протягом 2 тижнів спостерігалася тенденція до зниження параметрів мітохондріального дихання за умов окиснення ФАД і НАД-залежних субстратів. ВЖД не призводила до вірогідної зміни швидкості ОФ V_3 і швидкості поглинання кисню у контрольованому стані V_4 при окисненні всіх субстратів. Але відзначалося зменшення ДК V_3/V_4 на 32,89% ($p < 0,05$) при окисненні глутамату, за рахунок тенденції до зниження V_3 і зростання V_4 (рис. 3.6, контроль, ВЖД).

Після впливу ГП у щурів реєструвалася значна варіабельність показників, але без вірогідних змін в роботі мітохондрій. Спостерігалася тенденція до росту окиснення пірувату та пальмітоїлу як при ОФ, так і при контрольованому диханні, але також була відмічена динаміка зменшення ДК при використанні пірувату (рис. 3.6, контроль, ГП).

Проте при впливі ГП на щурів зі споживанням ВЖД спостерігалася збільшення V_3 при окисненні пірувату порівняно з групою ВЖД на 76,21% ($p < 0,05$), та зміна співвідношення в окисненні НАД-залежних субстратів глутамату і пальмітоїлу в бік останнього (рис. 3.6, ВЖД, ВЖД+ГП). Водночас відмічалася тенденція до зростання V_4 при окисненні пальмітоїлу та пірувату, що призводило до зменшення ДК при використанні глутамату, пальмітоїлу та пірувату порівняно з групою без ГП (рис. 3.6, ВЖД, ВЖД+ГП).

При порівнянні ВЖД+ГП з групою ГП без вживання ВЖД не виявлено змін V_3 , однак V_4 було вищим при окисненні глутамату та пірувату (на 58,46% та 85,39%, відповідно, при $p < 0,05$), мало тенденцію до підвищення при окисненні сукцинату, а відносно групи ВЖД відмічалось підвищення лише пірувату на 127,59% ($p < 0,05$) (рис. 3.6, ГП, ВЖД+ГП). Відповідно відзначалося зменшення ДК при окисненні глутамату, пальмітоїлу та пірувату порівняно з прекондичійованими щурами на 48,27%, 35,26% та 20,13%, відповідно ($p < 0,05$, рис. 3.6, ВЖД, ВЖД+ГП).

Одержані результати вказують на те, що ранні стадії ІР відзначалися незначною перебудовою окиснення енергетичних субстратів мітохондріями в бік погіршення окиснення НАД-залежного субстрату глутамату і ФАД-залежного сукцинату (зниження ДК), в той час як окиснення НАД-залежного ліпідного субстрату пальмітоїлу підтримувалося і демонструвало тенденцію до зростання V_3 . Це вказує на активацію пристосувальної перебудови мітохондрій серця на вживання ліпідних субстратів.

ГП не впливало на окисну функцію мітохондрій інтактних щурів, хоча була присутня тенденція до субстратної перебудови функції НАД-залежного

комплексу I ЕТЛ. Однак на тлі ВЖД відбувалася істотна перебудова функціональної активності мітохондрій.

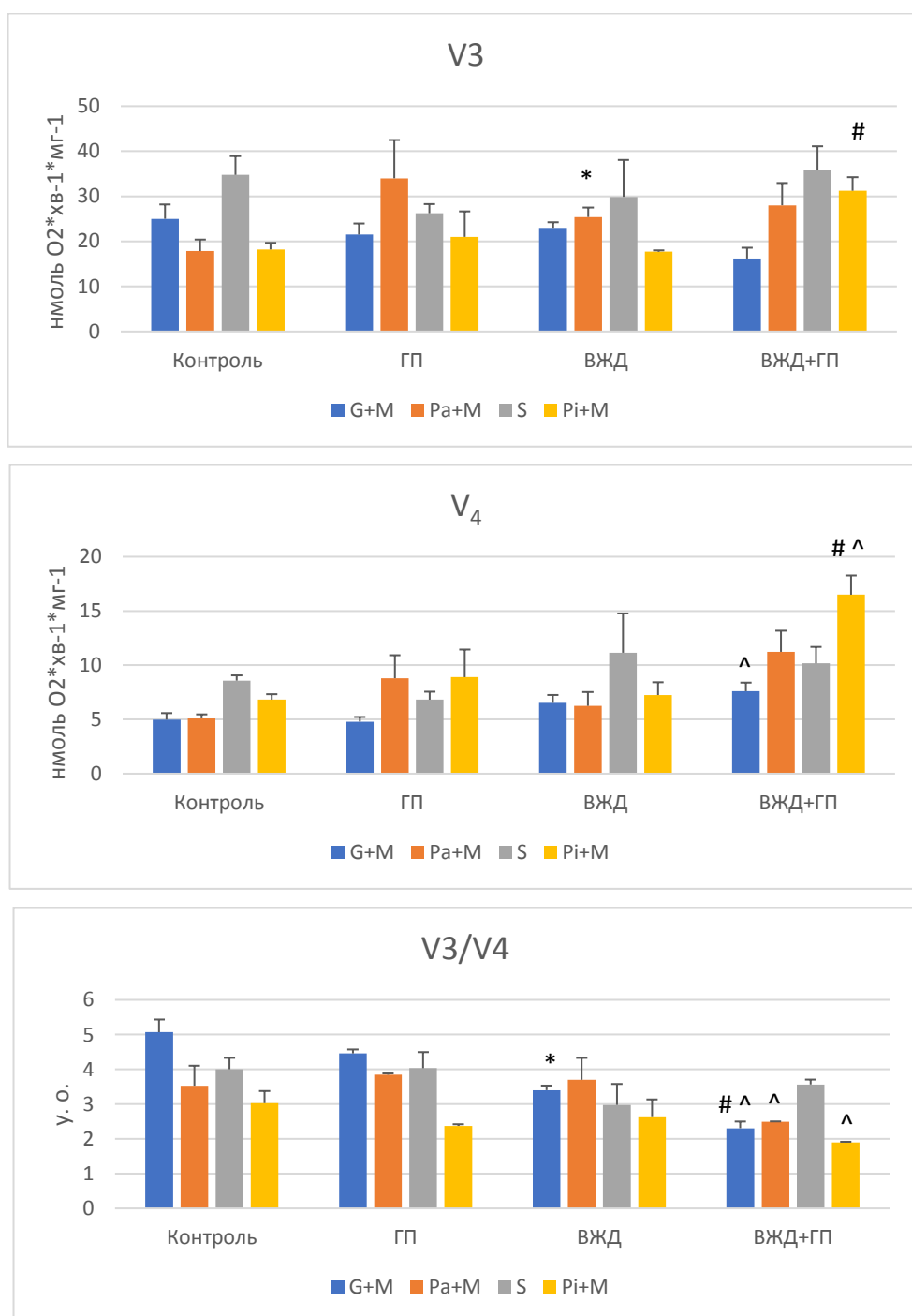


Рис. 3.6 Показники мітохондріального дихання в міокарді щурів при ВЖД та ГП при використанні різних енергетичних субстратів: глутамату+малату (G+M), пальмітоїлу+малату (Pa+M), сукцинату (S), пірувату+малату (Pi+M). * $p < 0,05$ порівняно з контролем, # $p < 0,05$ порівняно з ВЖД, ^ $p < 0,05$ порівняно з ГП

Під дією ГП у комплексі I ЕТЛ відбувалася дисфункція і субстратна перебудова в бік окиснення ліпідів, однак зберігалася функція комплексу II ЕТЛ, що властиво для стресових впливів, зокрема, гіпоксії. Водночас відбувалася активація гліколізу, тобто відзначалася компенсаторна стимуляція енергетичного метаболізму за рахунок окиснення пірувату. Також збільшувався резерв ОФ при роботі НАД-залежного комплексу I ЕТЛ, тобто збільшувалось спряження окиснення і фосфорилування.

Таким чином, ІР асоціювалася з розладом адаптивних механізмів енергетичного метаболізму при гіпоксії, що призводило до зростання чутливості мітохондрій до впливу ГП, проявів мітохондріальної дисфункції і зниження внеску ОФ у синтезі АТФ.

3.1.4 Вплив інсулінорезистентності та гіпоксичного прекондиціювання на розвиток окисного стресу у міокарді

Для визначення показників окисного стресу в тканині міокарда вивчали вміст ТБК-АП та відновленого Глу, активність СОД (конститутивної Cu-Zn-вмісної і індукцйбельної/мітохондріальної Mn-вмісної) та каталази.

У тварин при споживанні ВЖД відмічалось підвищення кількості продуктів окисдатовних реакцій ТБК-АП на 17,26% (рис. 3.7), але і антиоксидантного відновленого Глу більше як наполовину (на 52,71%), активність каталази зростала лише на 4,24% ($p < 0,05$), при цьому в активності СОД відзначалася тенденція до зменшення (рис. 3.8). Це може свідчити про помірну активацію вільнорадикальних процесів у тварин з ліпідним навантаженням, причому в міокарді головним компенсаторним механізмом антиоксидантного захисту виступає відновлений Глу. Що стосується індукції мітохондріальної Mn-СОД, то одержані результати свідчать про відсутність активації цієї ланки мітохондріальних захисних механізмів при ІР.

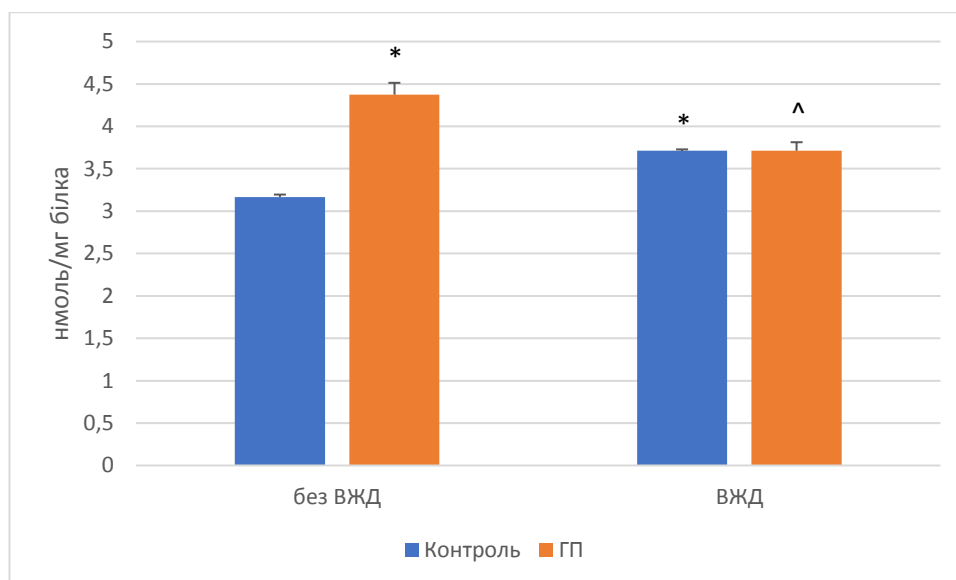


Рис. 3.7 Прояви ОС при ІР і впливі ГП - вміст ТБК-АП у тканині міокарда щурів. * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ^ $p < 0,05$ порівняно з ГП

У прекодиційованих тварин спостерігали зростання вмісту ТБК-АП на 38,11% відносно контролю, в той же час одночасно підвищувалися рівень відновленого Глу на 83,36% і активність каталази на 4,36% ($p < 0,05$). Активність СОД, як і при ВЖД, знижувалася (на 6,65% при $p < 0,05$) (рис. 3.8).

При дії ГП на тварин з ВЖД зростання ТБК-АП не спостерігалось, при цьому вірогідно зростали вміст відновленого Глу на 25,72% і зменшувалася активність СОД на 5,1% ($p < 0,05$)., тенденцію до зниження мала і активність каталази.

При порівнянні з дією ГП на інтактних щурів у тварин з ВЖД+ГП виявлено зменшення рівня окисного стресу за рахунок зниження кількості ТБК-АП на 15,11% ($p < 0,05$). Разом з тим активувалися захисні системи – зростав вміст відновленого Глу на 50,96% ($p < 0,05$), проте спостерігалось зниження активності каталази на 0,88% і СОД – на 2,63% ($p < 0,05$).

Одержані показники можуть свідчити, що ІР посилює прооксидантні процеси в міокарді, однак водночас посилюються компенсаторні механізми, за рахунок яких гальмується прооксидантна відповідь на ГП, яка розвивалася в інтактному міокарді. В якості основної компенсаторної ланки в міокарді була задіяна система Глу. Можна відмітити також незначну активацію каталази, тоді

як мітохондріальний механізм компенсації через індукцію Mn-SOD не активувався.

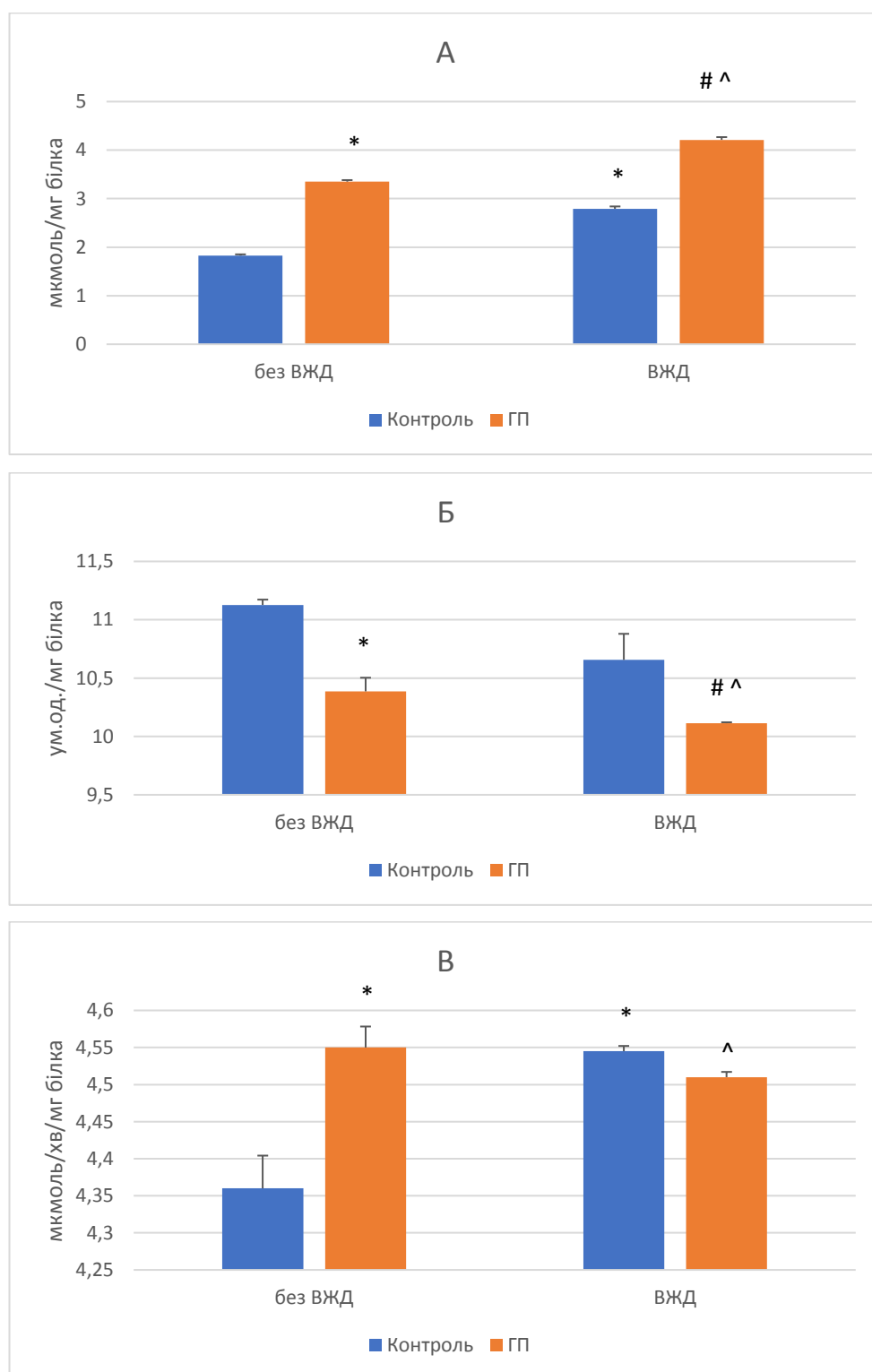


Рис. 3.8 Прояви ОС при ІР і впливі ГП: вміст відновленого Глу (А), показники активності СОД (Б) та каталази (В) у тканині міокарда щурів. * $p < 0,05$ порівняно з контролем, # $p < 0,05$ порівняно з ВЖД, ^ $p < 0,05$ порівняно з ГП

3.1.5 Вплив інсулінорезистентності та гіпоксичного прекондиціювання на рівень експресію білка PGC-1 α у міокарді

Рівень експресії білка PGC-1 α визначали у лівому та правому шлуночках серця. Виявлено, що вихідний рівень експресії білка PGC-1 α значно переважав у правому шлуночку (ПШ), ніж у ЛШ (у 3,43 рази при $p < 0,05$, рис. 3.9).

ВЖД вірогідно стимулювала рівень експресії PGC-1 у ЛШ (на 32,08% при $p < 0,05$), але не у ПШ.

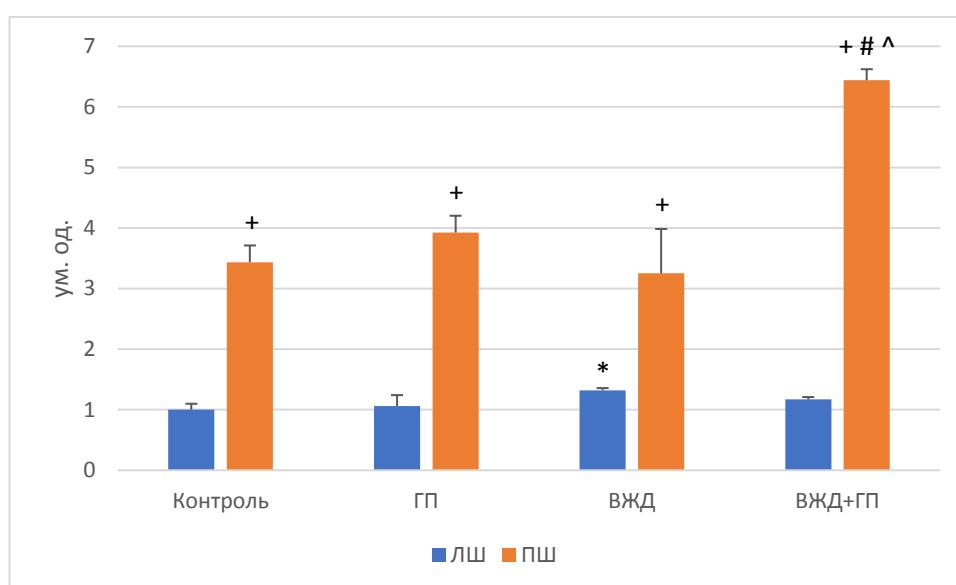


Рис. 3.9 Рівень експресії PGC-1 α у ЛШ і ПШ міокарда щурів при ІР та ГП. * $p < 0,05$ порівняно з контролем, # $p < 0,05$ порівняно з ВЖД, ^ $p < 0,05$ порівняно з ГП, + $p < 0,05$ ЛШ порівняно з ПШ

ГП не чинило суттєвого впливу на цей показник у ЛШ інтактних щурів, а у ПШ спостерігалась лише тенденція до зростання рівня експресії цього білка.

На відміну від цього, у щурів з ІР ГП викликало значне зростання рівня експресії PGC-1 α у ПШ (на 98,11% відносно групи ВЖД і на 64,06% відносно групи ГП, $p < 0,05$). Поряд з цим в ЛШ відмічалася тенденція до зменшення рівня експресії PGC-1 α .

Одержані результати вказують, що білок PGC-1 α відіграє більшу регуляторну роль в ПШ, ніж у ЛШ. При ліпідному навантаженні цей білок дещо

збільшує свою експресію в ЛШ, що вказує на залучення PGC-1 α в регуляцію ліпідного та вуглеводного обміну, в той час, як у ПШ його кількість є достатньою для здійснення цієї регуляції. Натомість ГП не мало істотного впливу на рівень PGC-1 α в обох шлуночках інтактного серця, що не підтримує припущення про його участь у прекондиціюванні. Однак на тлі ІР ГП призводило до значного зростання експресії білка PGC-1 α у ПШ, що може вказувати на більшу напруженість енергетичного метаболізму при ІР і підключення додаткових механізмів кардіопротекції. Така реакція у ПШ може відбуватися через більш виражену і швидшу реактивність захисних механізмів у відповідь на гіпоксичні впливи в цьому відділі серця.

3.1.6 Зміни ультраструктури міокарда і мітохондріального апарату кардіоміоцитів при інсулінорезистентності та гіпоксичному прекондиціюванні

При електронномікроскопічному дослідженні міокард контрольних тварин не мав ознак набряку, деструкції та інших патологічних змін (рис.3.10).

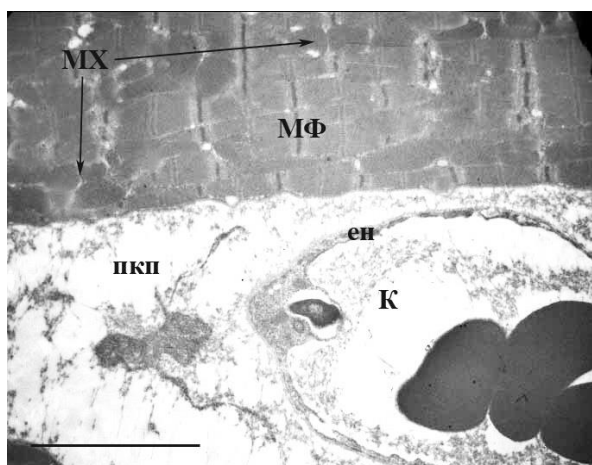


Рис. 3.10 Ультраструктура міокарду контрольних шурів. К – капіляр, МХ – мітохондрії, МФ – міофібрили, Н – набряк, Д – деструкція, пкп – перикапілярний простір, ен – ендотелій. Масштаб: 1 мкм

У якості пристосувального механізму для підтримання оптимального енергетичного метаболізму в цих умовах можна розглядати суттєво збільшену (в

середньому на 80-90% в залежності від субпопуляції) кількість мітохондрій (таб.1).

Таблиця 1

Морфометричні характеристики мітохондрій в кардіоміоцитах щурів експериментальних груп (M±m)

Групи тварин	Показники					
	Кількість мітохондрій, од/10 мкм ²		Кількість структурно змінених мітохондрій, %		Діаметр мітохондрій, мкм	
	СС	ІМФ	СС	ІМФ	СС	ІМФ
Контроль	14,7 ±1,2	10,4 ±1,8	6,2 ±0,6	3,5 ±0,7	0,58 ±0,05	0,81 ±0,07
ГП	18,9 ±1,5	14,3 ±1,4	18,3 ±3,4*	15,4 ±2,8*	0,73 ±0,10	0,95 ±0,04
ВЖД	16,7 ±1,1	13,3 ±1,0	5,4 ±1,1	4,2 ±0,9	0,63 ±0,08	0,76 ±0,06
ВЖД+ГП	19,9 ±2,1	14,8 ±1,1 *	5,0 ±0,8 ^	4,3 ±1,0 ^	0,61 ±0,06	0,91 ±0,05

Примітка: СС – субсарколемальні, ІМФ – інтраміофібрилярні, ГП – гіпоксичне прекодиціювання, ВЖД – високожирова дієта. * p<0,05 порівняно з контролем, ^p<0,05 порівняно з ГП.

При ІР, викликаній вживанням ВЖД, в міокарді щурів розвивалася ендотеліальна та сарколемальна дисфункції. Спостерігався набряк ендотелію капілярів (потовщення в середньому на 35-40%), його деструкція і набряк перикапілярних просторів, що призводило до загального потовщення гістогематичного бар'єру у міокарді (рис. 3.11). При цьому встановлена

відсутність розвитку мітохондріальної дисфункції: практично всі мітохондрії виявлялися інтактними, до того ж спостерігалася виражена тенденція до збільшення їх кількості в обох субпопуляціях (на 12-15% порівняно з контрольними значеннями).

Також визначалася активація ядерно-цитоплазматичного та міжмітохондріального транспорту і зростання кількості вільних та зв'язаних рибосом, котрі організовувалися у так звані «розетки» або «полісоми», що вважають свідченням активації синтезу білка та збільшує ефективність функціонування тРНК. Паралельно відзначалось збільшення активності набрякових та деструктивних процесів особливо щодо міофібрил та ендотелію капілярів. (таб. 1).

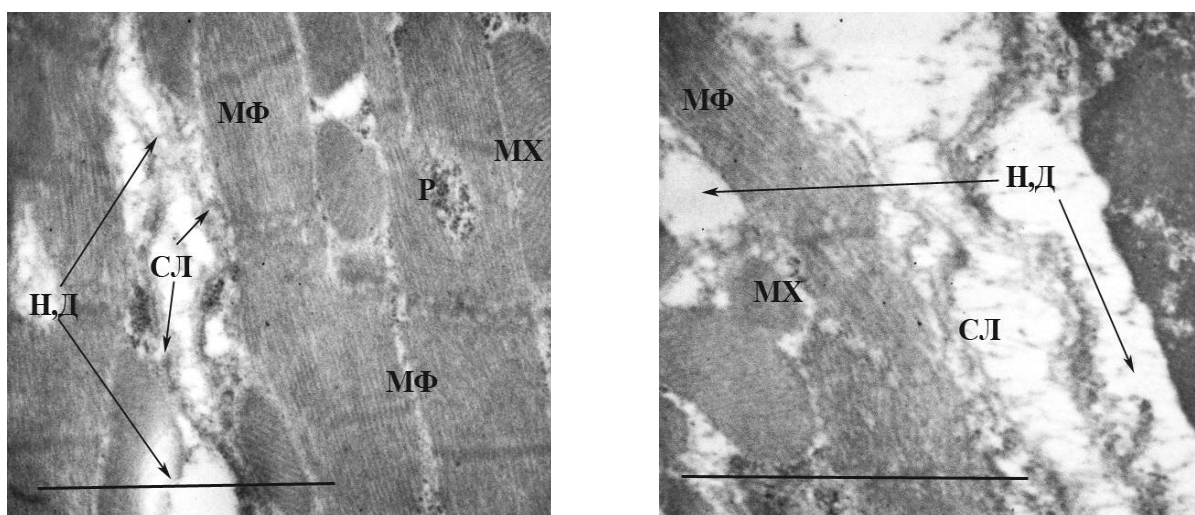


Рис. 3.11 Ультраструктура міокарду щурів при інсулінорезистентності, викликаний вживанням ВЖД. К – капіляр, МХ – мітохондрії, МФ – міофібрили, Н – набряк, Д – деструкція. Масштаб: 1 мкм

Вплив ГП характеризувався ознаками гіпергідратації міокарда, переважно локальної (рис. 3.12). Місцями утворювались характерні для гіпоксичного впливу (для розвитку вторинної тканинної гіпоксії) ворсинкоподібні утворення з боку сарколеми. У ворсинки входили мітохондрії, що призводило до зменшення шляху дифузії кисню і є пристосувальною реакцією на його нестачу. Спостерігалися

також набряк (потовщення) ендотелію капілярів, подекуди – набряк, розволокнення та деструкція міофібрил (рис. 3.12).

З боку мітохондріального апарату виявлено зростання кількості структурно ушкоджених мітохондрій (таб. 1), прояви мітофагії та утворення юних мітохондрій, що є пристосувальною реакцією, спрямованою на зростання потужності енергетичного метаболізму внаслідок прекондиціювання.

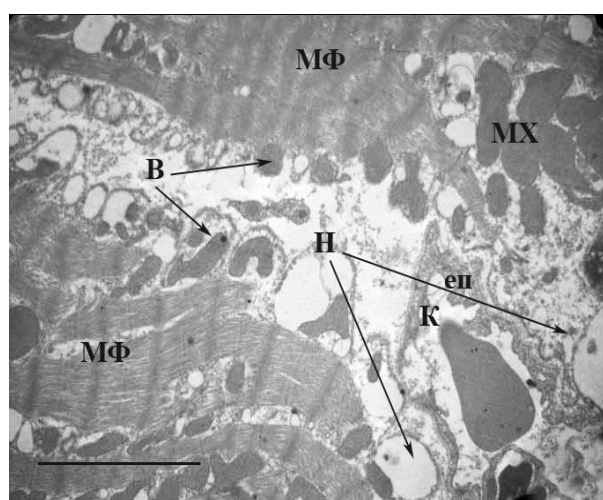


Рис. 3.12 Ультраструктура міокарду через 1 добу після гіпоксичного прекоондиціювання. К – капіляр, МХ – мітохондрії, МФ – міофібрили, В - ворсинкоподібні утворення, Н – набряк, ен – ендотелій. Масштаб: 1 мкм

Після ГП шурів з ІР (група ВЖД+ГП) найбільш характерні особливості ультраструктури міокарду виявляли як незначне пошкодження, так і виразні пристосувальні реакції. Міофібрили часто регіонально не мали чіткої структури, можливо, через гіпергідратацію міокарду, проте ендотеліальної дисфункції з вираженим набряком ендотелію гістогематичного бар'єру не спостерігалось (рис. 3.13). Крім того, значне розширення цистерн ендоплазматичного ретикулуму може вказувати на інтенсифікацію обміну кальцію.

Мітохондрії мали здебільшого нативну структуру, причому їх загальна кількість достовірно збільшувалася (більш виражено щодо інтраміофібрилярних мітохондрій), в тому числі й за рахунок процесів роз'єднання. Частина мітохондрій була у стані напруженої активності з різко розширеними

міжкристними проміжками (рис. 3.13). Кількість мітохондрій вірогідно зростала порівняно з групою без ГП, а стосовно фракції інтраміофібрилярних цей показник перевищував контрольну групу (таб. 1) Можна вважати, що у цих тварин енергетичний метаболізм є інтенсивним і його потужність зростала внаслідок прекодиціювання. Важливо також, що у тварин групи ВЖД+ГП кількість структурно змінених мітохондрій була вірогідно меншою, ніж у групі ГП (таб. 1), що вказує на захисний ефект ВЖД щодо підтримання цілісності мітохондрій при гіпоксії.

Отже, вплив ВЖД був потужним фактором збереження ультраструктури мітохондріального апарату міокарда, а відтак позитивним чинником для підтримання енергетичного метаболізму на адекватному рівні при гіпоксичному впливі.

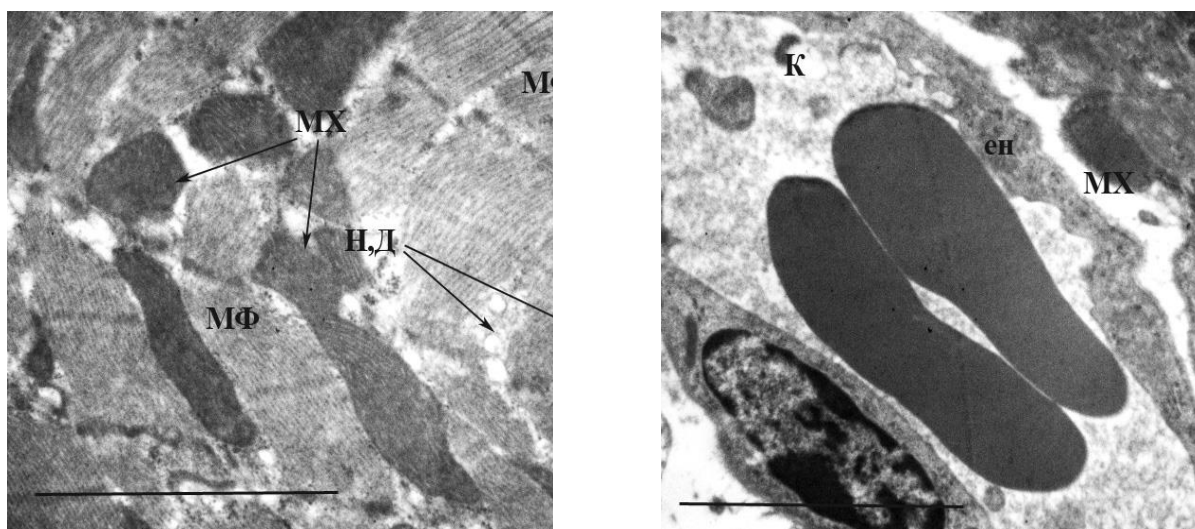


Рис. 3.13 Ультраструктура міокарду щурів при інсулінорезистентності, викликаній вживанням ВЖД, через 1 добу після гіпоксичного прекодиціювання. К – капіляр, МХ – мітохондрії, МФ – міофібрили, Н – набряк, Д – деструкція, ен – ендотелій. Масштаб: 1 мкм

Узагальнюючи одержані морфологічні та морфометричні дані, можна зробити такі підсумки. У міокарді інсулінорезистентних тварин розвивалася ендотеліальна та сарколемальна дисфункція, проте спостерігалось кількісне

зростання обох субпопуляцій мітохондрій, збереження їх функції та активації внутріклітинних зв'язків з іншими органелами. Покращення стану мітохондріального апарату може бути пов'язано з переходом цих органел на вживання ліпідних субстратів завдяки проявам ліпідної інфільтрації кардіоміоцитів при ВЖД. Також визначено зростання кількості вільних та зв'язаних рибосом, що свідчить про активацію синтезу білка.

ГП призводило до зростання мітохондріальної динаміки в міокарді з елімінацією ушкоджених органел шляхом мітофагії і біогенезом нових мітохондрій.

ГП інсулінорезистентних тварин відзначалося активацією мітохондріального апарату міокарду та енергетичного метаболізму, відсутністю мітохондріальної та ендотеліальної дисфункції, однак виявлялися ознаки пошкодження міофібрил.

У підсумку цього розділу досліджень можна зробити такі висновки:

Згідно з показниками ІТТ, глікемії та ліпідограми, ІР розвивається у щурів Wistar при споживанні ВЖД протягом 2 тижнів, що можна розглядати як ранній етап розвитку ІР з наявністю компенсованих порушень вуглеводного і ліпідного обміну. При цьому на тлі споживання ВЖД у щурів відбувалася перебудова ліпідного обміну, яка супроводжувалася підвищенням вмісту ХолЛПВЩ та тенденцією до зниження рівня ТГ у плазмі крові.

При ІР відбувалася перебудова використання енергетичних субстратів мітохондріями в бік погіршення окиснення НАД-залежного субстрату глутамату і ФАД-залежного сукцинату (зниження ДК), в той час як окиснення НАД-залежного ліпідного субстрату пальмітоїлу підтримувалося і демонструвало тенденцію до зростання V₃. Це вказує на активацію пристосувальної перебудови мітохондрій серця на вживання ліпідних субстратів.

ГП впливало на окисну функцію мітохондрій лише у щурів з ІР, при цьому у комплексі I ЕТЛ відбувалася дисфункція і субстратна перебудова в бік окиснення ліпідів, однак зберігалася функція комплексу II ЕТЛ. Водночас

відбувалася активація гліколізу. Також збільшувався резерв ОФ при роботі НАД-залежного комплексу I ЕТЛ, тобто збільшувалось спряження окиснення і фосфорилування. Таким чином, ІР асоціювалася з розладом адаптивних механізмів енергетичного метаболізму при гіпоксії, що призводило до зростання чутливості мітохондрій до впливу ГП, проявів мітохондріальної дисфункції і зниження внеску окисного фосфорилування у синтезі АТФ.

У щурів з ІР відбувалася помірна активація вільнорадикальних процесів у міокарді зі зростанням ТБК-АП на 17%, водночас посилювались компенсаторні механізми, за рахунок яких обмежувалася прооксидантна відповідь на ГП, яка розвивалася в інтактному міокарді. В якості основної компенсаторної ланки в міокарді була задіяна система Глу.

При ліпідному навантаженні мітохондріальний білок PGC-1 α збільшував свою експресію в ЛШ на 32%, що вказує на залучення PGC-1 α в регуляцію ліпідного та вуглеводного обміну, в той час, як у ПШ його кількість у контролі та при ІР була вищою у 3,2-3,4 рази. ГП не мало істотного впливу на рівень PGC-1 α в обох шлуночках інтактного серця, але при ІР ГП призводило до зростання експресії білка PGC-1 α у ПШ в 1,9 рази, що може вказувати на більшу напруженість енергетичного метаболізму при ІР і залучення додаткових механізмів кардіопротекції.

У міокарді інсулінорезистентних тварин розвивалася ендотеліальна та сарколемальна дисфункція, проте спостерігалось кількісне зростання обох субпопуляцій мітохондрій, збереження їх функції та активації внутріклітинних зв'язків з іншими органелами. Покращення стану мітохондріального апарату може бути пов'язано з переходом цих органел на вживання ліпідних субстратів завдяки проявам ліпідної інфільтрації кардіоміоцитів при ВЖД. Також визначено зростання кількості вільних та зв'язаних рибосом, що свідчить про активацію синтезу білка.

ГП призводило до зростання мітохондріальної динаміки в міокарді з елімінацією ушкоджених органел шляхом мітофагії і біогенезом нових мітохондрій. ГП інсулінорезистентних тварин відзначалося активацією

мітохондріального апарату міокарду та енергетичного метаболізму, відсутністю мітохондріальної та ендотеліальної дисфункції, однак виявлялися ознаки пошкодження міофібрил. Таким чином, ліпідне навантаження сприяло запуску потужних компенсаторних механізмів для оптимізації ультраструктури мітохондріального апарату міокарда, що сприяло кардіпротекції у напрямку підтримання енергетичного метаболізму при нестачі кисню.

Результати, викладені у розділі 3.1, опубліковані у наукових працях автора [90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105].

3.2 Дослідження кардіпротективних ефектів при ішемії-реперфузії ізольованого серця та їх мітохондріальних механізмів

3.2.1 Функціональна кардіпротекція при інсулінорезистентності та гіпоксичному прекодиціюванні

Ефективність кардіпротективних механізмів визначали за допомогою моделювання I/R ізольованого серця, вилученого в щурів різних експериментальних груп. Оцінку скоротливої функції ізольованого серця при постшемічній реперфузії здійснювали за показниками систолічного тиску у ЛШ (СТЛШ), тиску, що розвивав ЛШ (DP, ТрЛШ), максимальної (dP/dt_{max}) та мінімальної (dP/dt_{min}) швидкості змін тиску в ЛШ. Ці показники представляли як відсоткове співвідношення їх вимірювання на 20 хв реперфузії до їх реєстрації перед ішемією.

При визначенні СТЛШ виявили, що відсоток відновлення на 20 хв реперфузії до показників перед ішемією становив 92,1% (рис. 3.14, А). У щурів, які перебували на ВЖД, СТЛШ відновлювався краще (реєструвалося збільшення на 21,87% відносно контролю при $p < 0,05$).

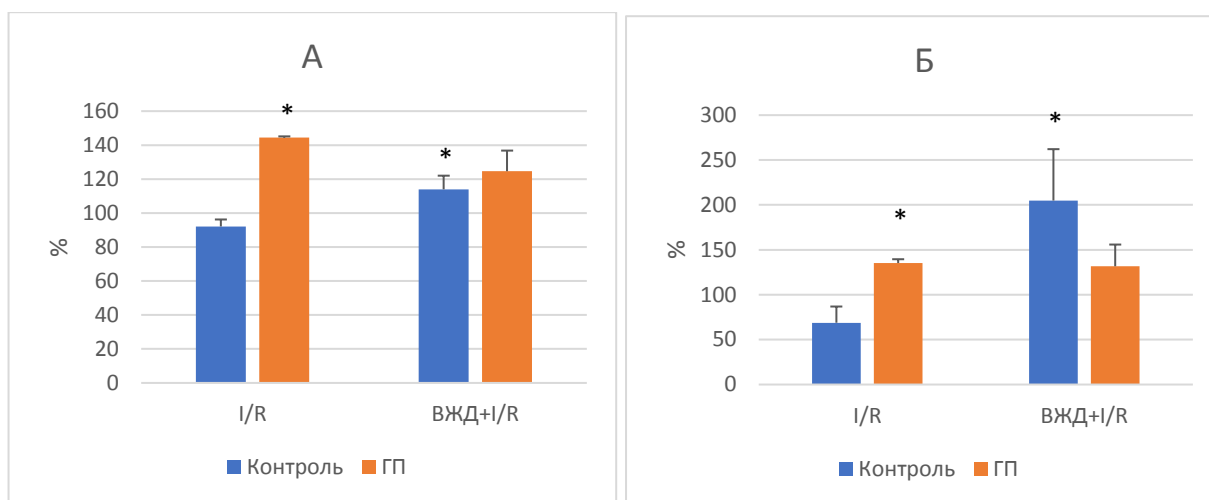


Рис. 3.14 Вплив ВЖД та ГП на відносні показники систолічного тиску ЛШ (А) та тиску, що розвивається ТрЛШ (Б), в ЛШ при I/R серця щурів. * $p < 0,05$ порівняно з контролем

Схожа картина спостерігалася і з ТрЛШ (рис. 3.14, Б) – ВЖД покращувала відновлення цього показника майже у 3 рази порівняно з контрольними тваринами ($p < 0,05$).

Зміни показників dP/dt_{max} та dP/dt_{min} (рис. 3.15) у тварин з ВЖД мали спільну динаміку, при якій спостерігалася їх зростання (для dP/dt_{max} на 52,9% проти контролю, $p < 0,05$), але для dP/dt_{min} зміни не були вірогідними через значну індивідуальну варіабельність.

Отже, споживання ВЖД щурами покращувало скоротливу функцію серця, а саме – прослідковувалося краще відновлення показників СТЛШ та ТрЛШ, максимальних швидкостей зростання та падіння тиску в ЛШ серця при постішемичній реперфузії.

ГП сприяло збільшенню відновлення СТЛШ в 1,57 рази та ТрЛШ на 66,5% порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$) (рис. 3.14).

Відновлення показників dP/dt_{max} та dP/dt_{min} під дією ГП також покращувалося на 16,1% та 15,6%, відповідно ($p < 0,05$) (рис. 3.15).

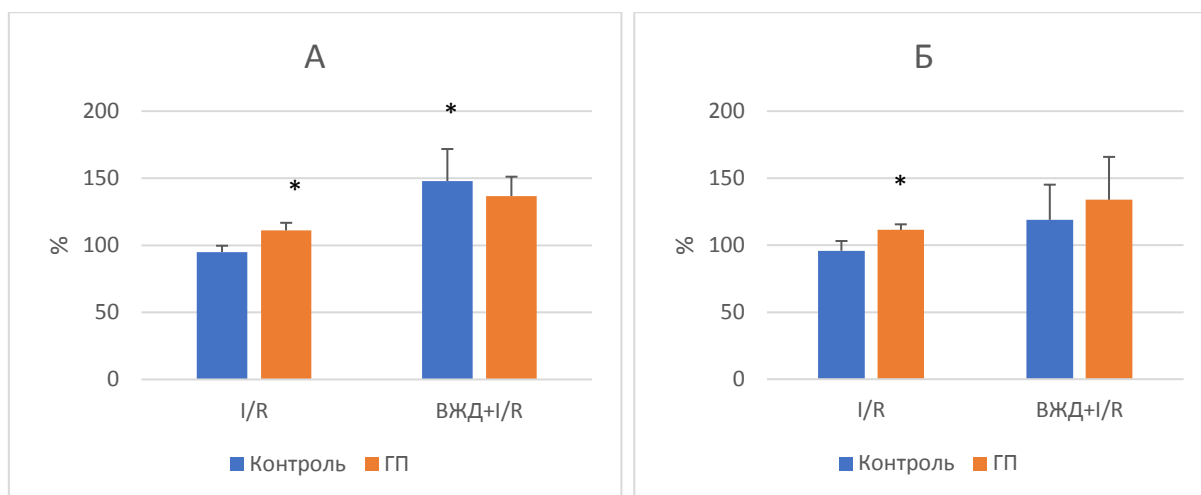


Рис. 3.15 Вплив ВЖД та ГП на відносні показники максимальної dP/dt_{\max} (А) та мінімальної dP/dt_{\min} (Б) швидкості змін тиску в ЛШ при I/R серця щурів. * $p < 0,05$ порівняно з контролем

Застосування ГП у щурів з ВЖД, натомість, не призводило до покращення відновлення СТЛШ, і навіть відзначалася тенденція до зменшення ТрЛШ (рис. 3.14).

Аналогічним чином, у щурів з ІР при ГП не покращувався показник dP/dt_{\max} , хоча він залишався вищим, ніж у контрольній групі. А dP/dt_{\min} мав тенденцію до зростання (рис. 3.15).

Отже, ліпідне навантаження сприяло зростанню скоротливої функції, зокрема, СТЛШ і ТрЛШ. ГП сприяло покращенню скоротливої функції серця при постішемичній реперфузії, що проявлялося у зростанні СТЛШ, ТрЛШ, меншою мірою - dP/dt_{\max} та dP/dt_{\min} , але його протекторний ефект на скоротливу функцію серця не спостерігався при ІР.

З метою оцінки антиаритмічних ефектів визначали появу тяжких аритмій, які виникали під час реперфузії, і виражали їх кількість як відсоток сердець, що розвивали аритмії, до кількості сердець у групі.

Встановлено, що при I/R 80% сердець розвивали тяжкі аритмії, тоді як після ГП цей показник зменшувався вдвічі (рис. 3.16). Серця з ІР характеризувалися розвитком тяжких аритмій у 82% випадків, а після ГП – у 90% (рис. 3.16).

Було виявлено, що найбільш часто серед аритмій спостерігалася фібриляція шлуночків. Після ГП спостерігали зменшення частоти фібриляції шлуночків і зростання поперечної блокади серця. Споживання ВЖД характеризувалося найменшою кількістю фібриляції шлуночків, натомість у 60% випадків розвивалися тяжкі брадикардії.

Після ГП у серцях з ІР не відбувалося істотного антиаритмогенного ефекту порівняно з групою без ГП, але слід відзначити незначне зростання частоти фібриляції шлуночків і зменшення частоти брадикардій. Водночас при порівнянні з групою ГП без ВЖД звертає на себе увагу суттєве зменшення частоти розвитку поперечної блокади на користь брадикардій.

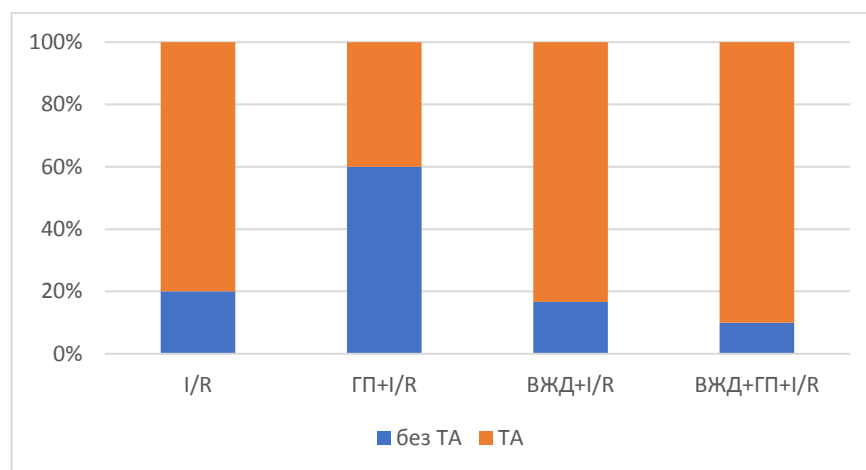


Рис. 3.16 Вплив ВЖД та ГП на частоту розвитку тяжких аритмій (ТА) при І/Р серця щурів

Таким чином, ГП мало антиаритмічний ефект під час постішемичної реперфузії. У серцях з ІР спостерігали негативні хронотропні ефекти, що може вказувати на зменшення збудливості і появу мітохондріальної дисфункції. Після ГП серця з цієї групи незначно відновлювали збудливість, але загальні антиаритмічні ефекти ГП щодо розвитку тяжких аритмій не спостерігалися. Разом з тим, покращувалася функція проведення через синоатріальний вузол порівняно з серцями тварин без ВЖД.

3.2.2 Розмір інфаркту при інсулінорезистентності та гіпоксичному прекондиціюванні

Для оцінки структурної кардіопротекції після I/R визначали розмір інфаркту у відносних показниках. За 100% вважали середню арифметичну обрахованої зони інфаркту у серцях контрольних тварин (рис. 3.17).

Визначено, що споживання ВЖД не здійснювало вірогідний вплив на розмір інфаркту. Після ГП розмір інфаркту вірогідно зменшувався як в контролі, так і у серцях щурів з ВЖД, хоча у останніх варіабельність показника була більшою (рис. 3.17).

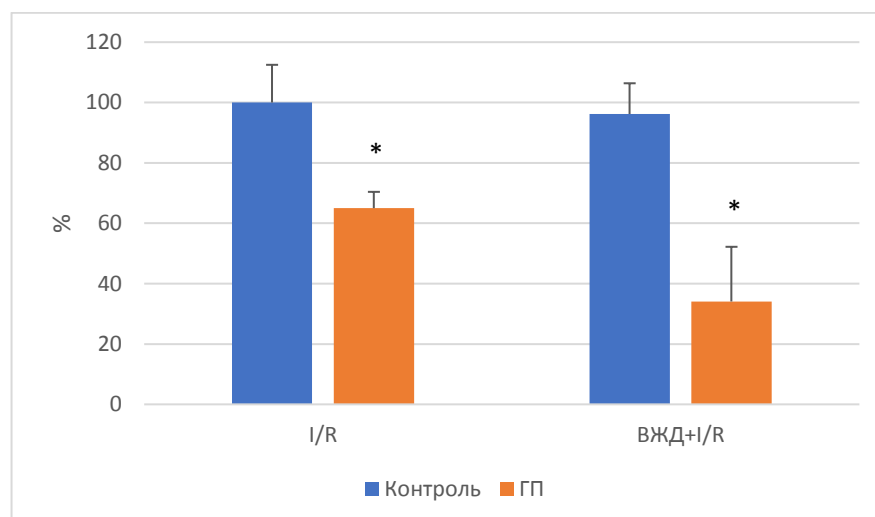


Рис. 3.17 Вплив ГП та ІР на розмір інфаркту в ізольованому серці при I/R, нормалізований до показників у серцях контрольних щурів без ВЖД. * $p < 0,05$ порівняно з групою без ГП

Таким чином, ІР не мала суттєвого впливу на площу інфаркту при моделюванні I/R ізольованого серця, а ГП зменшувало ділянку ураження міокарда як при наявності ІР, так і без неї. Ліпідне навантаження не викликало зростання площі інфаркту.

3.2.3 Прояви окисного стресу при інсулінорезистентності та гіпоксичному прекоондиціюванні

Встановлено, що I/R сприяла посиленню ОС за рахунок збільшення продукції прооксидантів, представлених ТБК-АП, на 83,63% порівняно з показниками до ішемії (рис. 3.18, див. рис. 3.7).

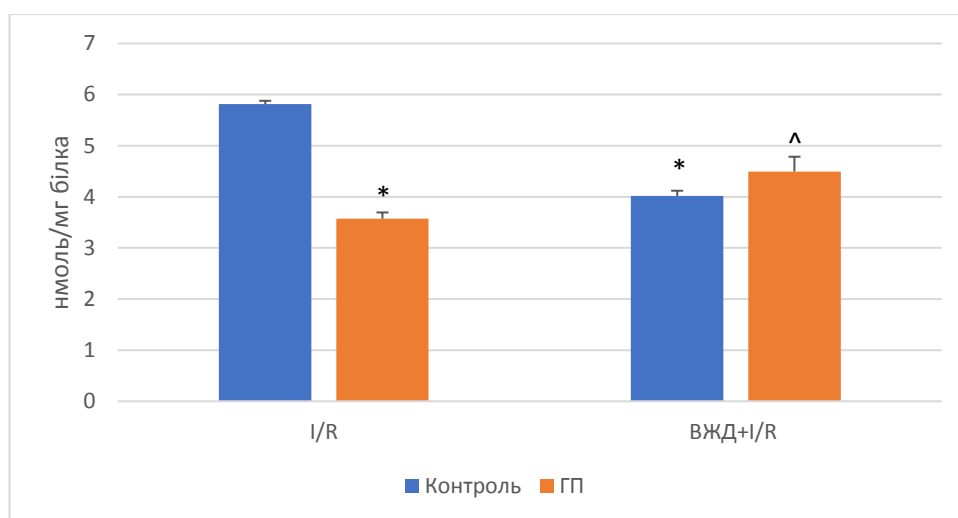


Рис. 3.18 Вплив ГП на прояв ОС при ІР після I/R - вміст ТБК-АП у тканині міокарда щурів. * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ^ $p < 0,05$ порівняно з ГП

Водночас виявлено зміни антиоксидантних механізмів: зниження вмісту захисного відновленого Глу на 54,71%, активності СОД на 25,15% порівняно з інтактними щурами ($p < 0,05$). При цьому зростала активність каталази на 14,6% ($p < 0,05$) (рис. 3.19). Одержані показники свідчать, що при реперфузійному синдромі розвиток ОС більшою мірою стримується за рахунок каталази, тоді як глутатіонова система та СОД зменшують свою спроможність у протидії ОС.

Після ГП рівень ТБК-АП зменшувався на 38,5%, вміст відновленого Глу зростав на 22,6%, активність СОД зменшувалась на 16%, а активність каталази залишалася незмінною. Це може свідчити про попередження розвитку ОС при I/R внаслідок ГП. Можна припускати залучення до цього ефекту мітохондріальних механізмів через обмеження продукції цими органелами вільнорадикальних сполук, оскільки напруженість антиоксидантного захисту залишалася зниженою.

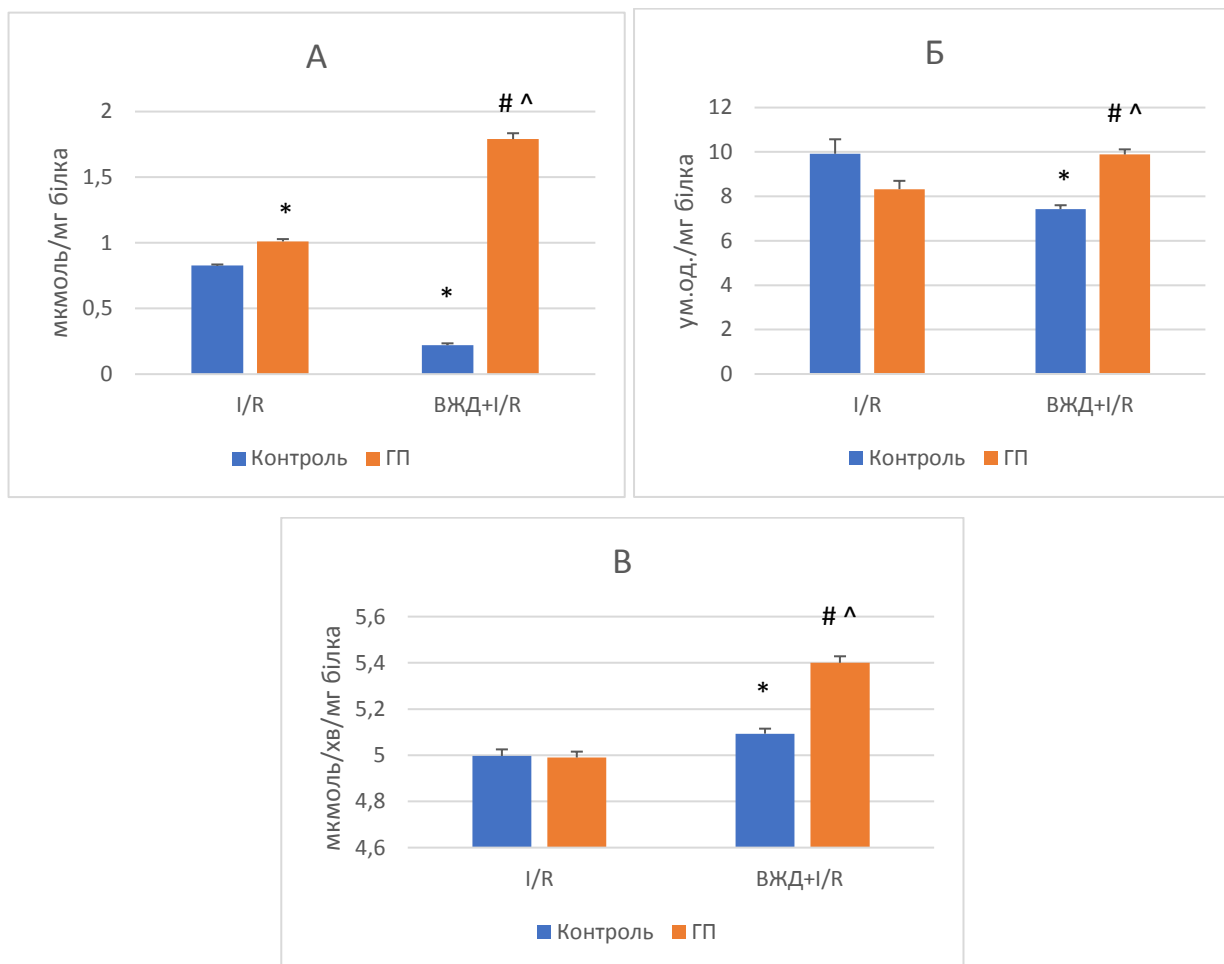


Рис. 3.19 Вплив ГП на прояв ОС при ІР після І/Р: вміст відновленого Глу (А), показники активності СОД (Б) та каталази (В) у тканині міокарда щурів. * $p < 0,05$ порівняно з контролем, # $p < 0,05$ порівняно з ВЖД, ^ $p < 0,05$ порівняно з ГП

У групі з вживанням ВЖД у порівнянні з доішемічним рівнем рівень ТБК-АП практично не змінився (рис. 3.18, див. рис. 3.7). Це могло відбуватися завдяки дії антиоксидантних систем, а саме, за рахунок значного виснаження вмісту відновленого Глу, тоді як рівень СОД незначно зменшувався, а підвищений доішемічний рівень активності каталази продовжував зростати. Відповідно до цього, прояви ОС у серцях з ІР після І/Р також були меншими при порівнянні з контрольними серцями після І/Р, а саме зменшувався рівень ТБК-АП на 30,91% ($p < 0,05$). Разом з тим, зростала активність каталази на 1,93%, знижувалася кількість відновленого Глу на 73,37% і активність СОД на 25,15% ($p < 0,05$). Можна

зауважити, що розвиток ОС при I/R у серцях з ВЖД ефективно стримувався активованими раніше компенсаторними механізмами системи Глу та каталазою, тоді як роль СОД була менш значною.

Після ГП у цій групі рівень ОС (за накопиченням ТБК-АП) практично не змінювався у порівнянні з показниками без ГП (рис. 3.18) і зростав лише на 21,3% порівняно з доішемичним рівнем (див. рис. 3.7). Це досягалося за рахунок збільшення рівня відновленого Глу у 8,14 разів, активності СОД – на 33,3%, активності каталази – на 6,1% порівняно з показниками у групі без ГП. Потрібно зазначити, що після ГП доішемичний рівень вмісту відновленого Глу у цій групі був максимальним, а активність СОД і каталази залишилася незмінною, що дозволило обмежити зростання окисного стресу у серцях з ВЖД і навіть підвищити резерв відновленого Глу. При порівнянні з ефектами ГП у контрольних щурів вміст ТБК-АП у групі ВЖД+ГП при I/R був на 30% вищим, вміст відновленого Глу – на 77,2% вищим, активність СОД і каталази – на 18,8 і 8% вищою, відповідно.

Отже, у щурів з ВЖД ГП не мала виразного позитивного впливу на постреперфузійні прояви ОС, як це спостерігалось у контролі. Однак зростання ОС при I/R порівняно з доішемичним рівнем було у щурів з ВЖД+ГП значно меншим, що досягалося за рахунок доішемичного напруження систем антиоксидантного захисту. На відміну від інших груп, у цих серцях у процесах антиоксидантного захисту більш збереженою залишалася система Глу і до нього включалася система СОД.

3.2.4 Зміни рівня експресії білка PGC-1 α при ішемічно-реперфузійному пошкодженні в умовах інсулінорезистентності та гіпоксичного прекондиціювання

В динаміці I/R спостерігались певні відмінності змін рівня експресії PGC-1 α у контрольних щурів та тварин з IP. Так, у ЛШ не спостерігали вірогідних змін рівня експресії PGC-1 α порівняно з доішемичним рівнем (рис. 3.20, Б). У ПШ, де

вихідний рівень експресії був значно вищим, після I/R він різко зменшувався (у 2,7 разів при $p < 0,05$), але залишався в 1,47 рази вищим, ніж в ЛШ. ГП не мало істотного впливу на ці параметри в обох шлуночках (рис. 3.20, Г).

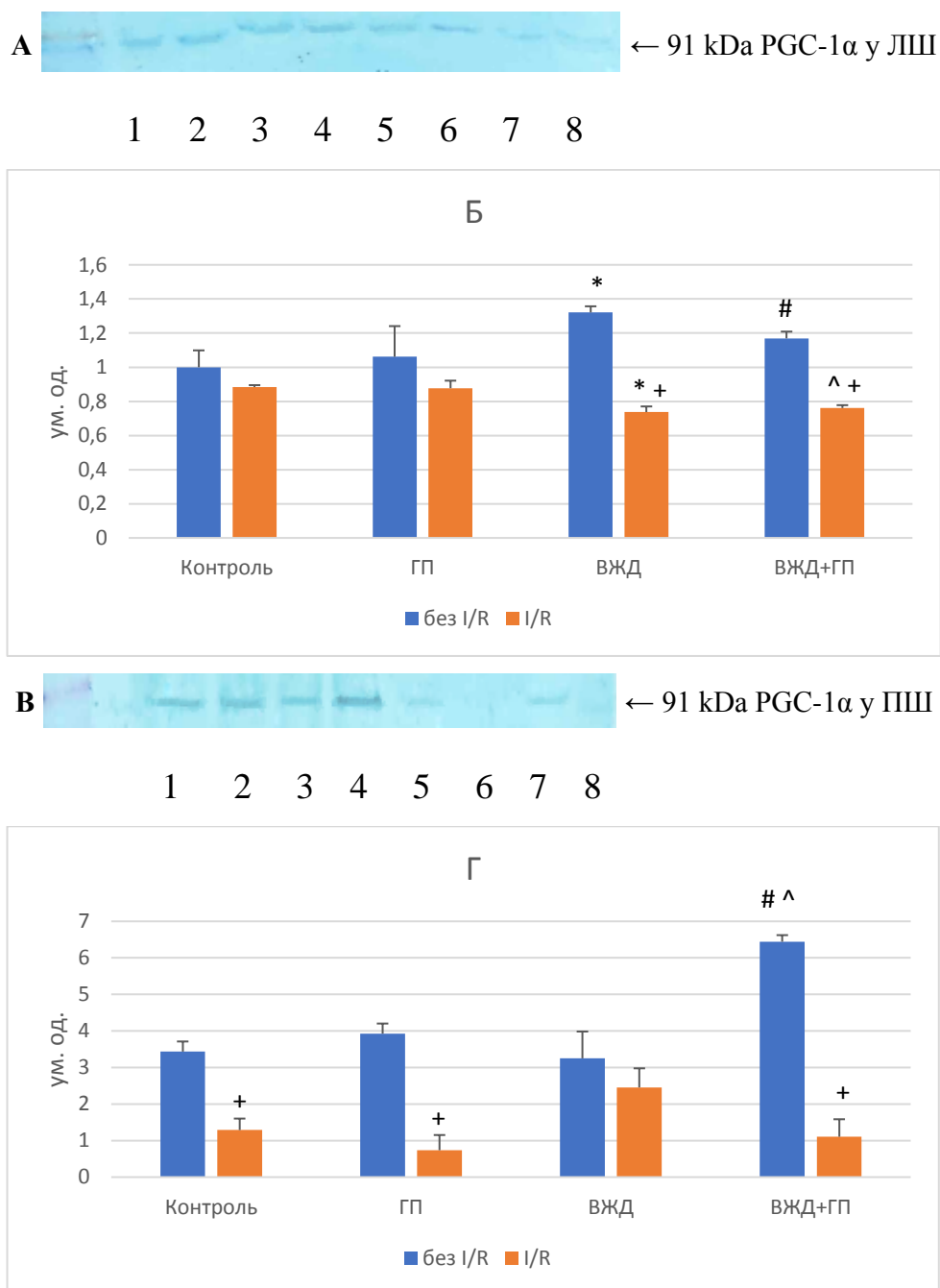


Рис. 3.20 Репрезентативний блот (А, В) та денситометричні показники рівня експресії PGC-1α у ЛШ (Б) і ПШ (Г) міокарда щурів при ІР та ГП до та після моделювання I/R. 1 – Контроль, 2 – ГП, 3 – ВЖД, 4 - ВЖД+ГП, 5 - I/R, 6 - ГП+ I/R, 7 - ВЖД+ I/R, 8 - ВЖД+ГП+ I/R. * $p < 0,05$ порівняно з контролем, # $p < 0,05$ порівняно з ВЖД, ^ $p < 0,05$ порівняно з ГП, + $p < 0,05$ порівняно з I/R

Натомість, у серцях з ВЖД при I/R рівень експресії білка знижувалась в ЛШ (в 1,2 рази, $p < 0,05$), а в ПШ це не відбувалося. Після ГП та I/R у цих тварин показники зменшувалися в обох шлуночках: до рівня контролю у ПШ і нижче за нього – у ЛШ (рис. 3.20).

Одержані показники вказують на залучення PGC-1 α у перебіг I/R у ПШ, при цьому ГП не впливає на цей механізм. Натомість, при вживанні ВЖД ГП індукує PGC-1 α у ПШ, а при I/R сприяє зменшенню показників рівня експресії PGC-1 α і відновленню залежних від нього механізмів до таких у контрольній групі. Отже, ВЖД сприяє інтенсифікації PGC-1-залежних механізмів регуляції в ЛШ серця при I/R. ГП залучає PGC-1-залежні механізми регуляції лише при IP в ПШ серця.

3.2.5 Ультраструктурні прояви кардіопротекції при ішемії-реперфузії та її мітохондріальні механізми

Після I/R спостерігали значні зміни ультраструктури міокарду щурів досліджених груп. Виявляли значні зміни міофібрил з ознаками розшарування, набряку, втрати поперечної посмугованості (рис. 3.21).

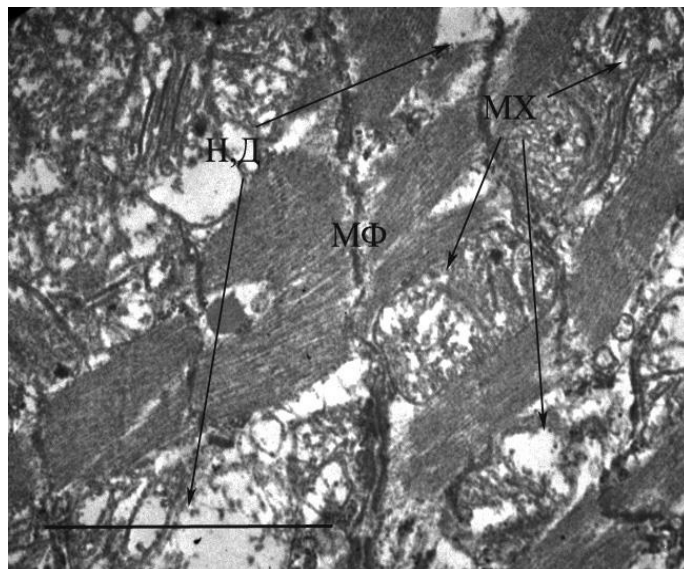


Рис. 3.21 Ультраструктура міокарду щурів після I/R. MX – мітохондрії, МФ – міофібрили, Н – набряк, Д – деструкція. Масштаб: 1 мкм

Перикапілярний простір характеризувався значним набряком, що погіршувало функцію гематопаренхіматозного бар'єру. Прояви ендотеліальної дисфункції були незначними. Мітохондріальна дисфункція була різко вираженою (рис. 3.21, таб. 2), переважна кількість мітохондрій, як ІМФ, так і СС, мала ознаки деструкції: втрату регулярності структури з пошкодженням мембран та крист, набряк, вакуолізацію, преципітати кальцію.

Таблиця 2

Морфометричні характеристики мітохондрій в кардіоміоцитах щурів експериментальних груп при ішемії-реперфузії (M±m)

Групи тварин	Показники					
	Кількість мітохондрій, од/10 мкм ²		Кількість структурно змінених мітохондрій, %		Діаметр мітохондрій, мкм	
	СС	ІМФ	СС	ІМФ	СС	ІМФ
I/R	18,2 ±2,4	14,3 ±1,2	61,2 ±6,3*	71,0 ±8,4*	0,96 ±0,07*	0,98 ±0,08
ГП+I/R	17,6 ±1,4	14,8 ±2,1	18,2 ±3,1+	16,4 ±2,9+	0,78 ±0,06	0,94 ±0,05
ВЖД+I/R	17,9 ±2,3	13,7 ±2,2	16,5 ±2,4 *#+	17,7 ±1,3 *#+	0,70 ±0,06+	0,89 ±0,08
ВЖД+ГП+I/R	15,6 ±2,2	12,4 ±1,9	11,2 ±1,1 *#+	10,3 ±1,4 *#+	0,78 ±0,05*+	0,96 ±0,05 #

Примітка: СС – субсарколемальні, ІМФ – інтраміофібрилярні, ГП – гіпоксичне прекодиціювання, ВЖД – високожирова дієта, I/R – ішемія-реперфузія. * p<0,05 порівняно з контролем, # p<0,05 порівняно з ВЖД, ^ p<0,05 порівняно з ГП, + p<0,05 порівняно з I/R.

При аналізі впливу I/R на міокард ізольованого серця шурів виявлено значущі порушення ультраструктури мітохондрій. Зокрема, на тлі посилення набрякових та деструктивних процесів міофібрил з розволокненням та деструкцією м'язових волокон відбувалося особливо виразне пошкодження мітохондріального апарату кардіоміоцитів (рис. 3.21). Причому, окрім вакуолізації та деструкції крист, просвітлення міжкристних проміжків, мало місце суттєве (в середньому на 20-50% в залежності від субпопуляції мітохондрій) збільшення діаметру мітохондрій, що вважається незворотними змінами, та загибель мітохондрій за некротичним типом.

При попередньому впливі ГП на шурів ультраструктура міокарда після I/R виявлялася краще збереженою. Зокрема, набряк та деструкція м'язових волокон були меншими. Мітохондрії були часто нативної структури або з меншими структурними пошкодженнями (рис. 3.22). Слід звернути увагу на те, що міжкристні проміжки в мітохондріях набували щільної структури. Такі зміни розглядають як один з перших етапів мітоптозу, що є проявом сприятливої мітохондріальної динаміки для компенсації порушень енергетичного обміну. Кількість пошкоджених мітохондрій в міокарді шурів вірогідно зменшувалася порівняно з групою без ГП (таб. 2).

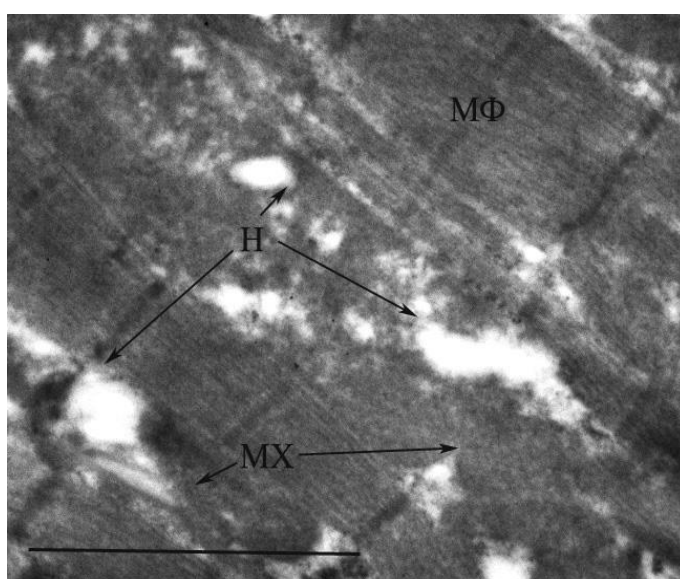


Рис. 3.22 Ультраструктура міокарду шурів після ГП та I/R. MX – мітохондрії, МФ – міофібрили, Н – набряк, Д – деструкція. Масштаб: 1 мкм

ВЖД здійснювала сприятливий вплив щодо попередження мітохондріальної дисфункції при I/R (група ВЖД+I/R). Значна кількість мітохондрій мали інтактну структуру (рис. 3.23).

Збереженість нативної ультраструктури органел стає зрозумілою, якщо звернути увагу на жирові краплі, щільно огорнуті мітохондріями, оскільки жир в цьому випадку відіграє роль будівельного матеріалу, котрий сприяє відновленню ультраструктури. Активація обмінних процесів відбувалася в міокарді не тільки щодо ліпідних компонентів, але й відносно білка, про що свідчить збільшена кількість рибосом в клітинах міокарду. У групі ВЖД+I/R вірогідно зростала кількість структурно пошкоджених мітохондрій обох фракцій порівняно з доішемичним рівнем (група ВЖД), але вона була значно меншою за показники в групі I/R без вживання ВЖД (таб. 2), що також свідчить про захисний вплив ВЖД на мітохондрії при I/R. Можна відзначити також, що ВЖД попереджувало набряк СС мітохондрій при I/R (таб. 2).

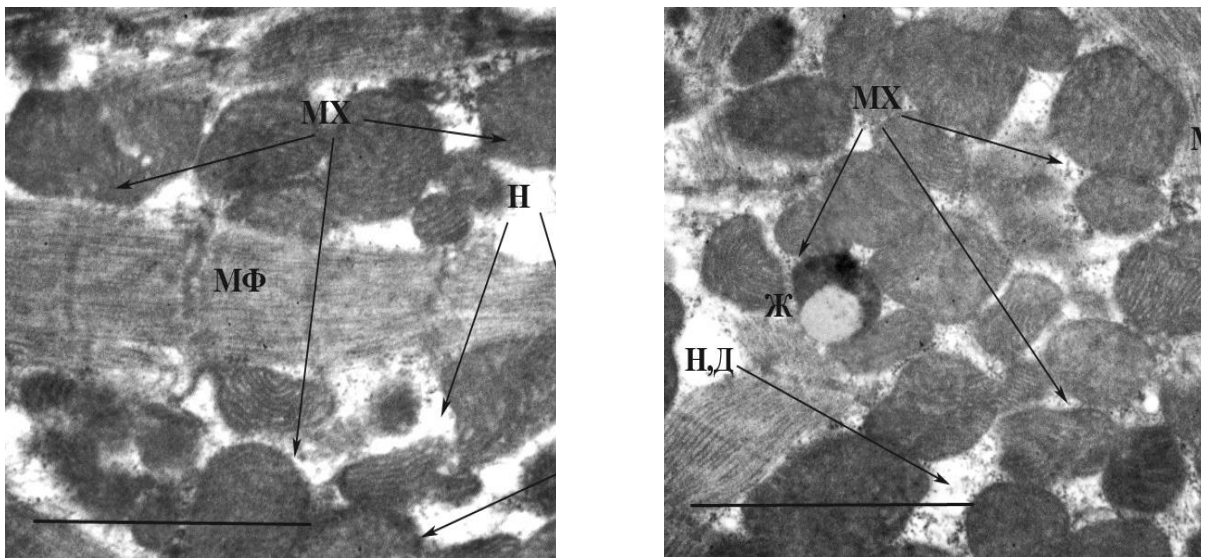


Рис. 3.23 Ультраструктура міокарду щурів при ВЖД та I/R. MX – мітохондрії, MF – міофібрили, P – рибосоми, Ж – жирова крапля, H – набряк, Д – деструкція. Масштаб: 1 мкм

За умов ГП та I/R при IP (група ВЖД+ГП+I/R) треба відмітити, що мітохондріальний апарат міокарду в обох лініях щурів виявлявся структурно дещо

гірше збереженим, ніж у групі ВЖД+I/R, але кращим, ніж у групі ГП+I/R. Причому кращу ультраструктуру мали органели, котрі тісно прилягали до жирових крапель, що може свідчити про вживання ліпідів мітохондріями міокарду для підтримання енергетичного обміну. У порівняльному плані, ВЖД відіграло сприятливу роль щодо збереження мітохондрій та більш шкідливу відносно м'язових волокон. Ультраструктура м'язових волокон виявлялася кращою, ніж при окремих впливах ВЖД+I/R або ГП+I/R, однак спостерігались окремі випадки перескорочення міофібрил. Набрякові та деструктивні процеси в тканині серця були менш виражені, ніж при окремих впливах ВЖД+I/R або ГП+I/R. Кількісні показники мітохондріального апарату у групі ВЖД+ГП+I/R не мали вірогідних відмінностей від груп ГП+I/R та ВЖД+I/R, за винятком вірогідного помірного зменшення кількості пошкоджених ІМФ мітохондрій порівняно з групою ВЖД+I/R без ГП (таб. 2, рис. 3.24).

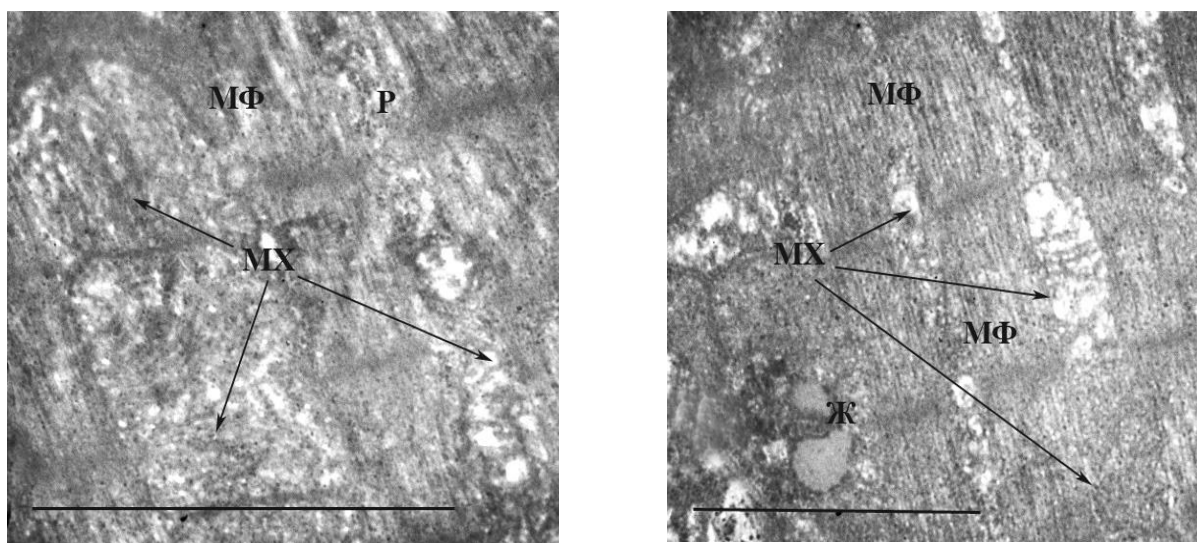


Рис. 3.24 Ультраструктура міокарду щурів при ВЖД, ГП та I/R. МХ – мітохондрії, МФ – міофібрили, Р – рибосоми, Ж – жирові краплі, Н – набряк, Д – деструкція. Масштаб: 1 мкм

Ці дані вказують, що прекодиціювання не спричинювало виразних ефектів на ішемічно-реперфузійне пошкодження мітохондрій у щурів з ІР, де основним

захисним чинником вже було вживання ВЖД. Отже, ГП частково втрачає кардіопротекторний ефект при ІР порівняно з впливом на інтактний міокард.

Узагальнюючи одержані морфологічні та морфометричні дані, можна зробити такі підсумки. Ішемічно-реперфузійне пошкодження супроводжувалося розвитком набрякових та деструктивних процесів у серці щурів при І/Р, в тому числі, пошкодженням і дисфункцією мітохондрій. ГП сприяло зменшенню пошкодження мітохондрій і м'язових волокон з проявом сприятливої мітохондріальної динаміки з метою компенсації порушень енергетичного метаболізму.

При ІР у щурів спостерігався сприятливий вплив ліпідного навантаження щодо попередження мітохондріальної дисфункції у реперфузованих серцях. ГП незначно обмежувало деструктивні та набрякові процеси в міокарді, але не призводило до виразних ефектів на ішемічно-реперфузійне пошкодження мітохондрій у щурів з ІР.

Таким чином, ІР при ВЖД супроводжується зростанням мітопротекції в міокарді. При цьому ГП частково втрачає кардіопротективний, в тому числі, мітопротективний, ефект при ІР порівняно з впливом на інтактний міокард.

Підсумовуючи результати, викладені у цьому розділі, можна зробити такі висновки.

Ліпідне навантаження сприяло підтриманню скоротливої функції при постішемічній реперфузії, зокрема, СТЛШ і ТрЛШ. ГП сприяло покращенню скоротливої функції серця при постішемічній реперфузії, що проявлялося у зростанні СТЛШ, ТрЛШ, меншою мірою - dP/dt_{max} та dP/dt_{min} , зменшувало частоту розвитку тяжких аритмій, але його протективний ефект на скоротливу функцію серця та розвиток тяжких аритмій не спостерігався при ІР.

ІР не мала суттєвого впливу на площу інфаркту при моделюванні І/Р ізольованого серця, а ГП зменшувало цей показник як при наявності ІР, так і без неї.

Прояви окисного стресу у серцях з ІР після І/Р зменшувалися за накопиченням ТБК-АП на 31%, що забезпечувалося активованими у цих щурів компенсаторними механізмами системи Глу та каталазою, тоді як роль СОД була менш значною. ГП попереджувало розвиток окисного стресу на 38,5% у контролі, але не впливало на показники у щурів з ІР. На відміну від інших груп, у серцях з ІР у процесах антиоксидантного захисту більш збереженою залишалася система Глу і до нього включалася система СОД.

Високі показники рівня експресії PGC-1 α у ПШ та їх зниження після І/Р вказують на залучення цього білка у перебіг І/Р у ПШ, при цьому ГП не впливає на цей механізм. У ЛШ ці процеси не відбуваються. Натомість, ІР сприяла інтенсифікації PGC-1-залежних механізмів регуляції в ЛШ серця при І/Р, а також підсилювала PGC-1-залежні механізми регуляції в ПШ при дії ГП.

Ішемічно-реперфузійне пошкодження супроводжувалося розвитком набрякових та деструктивних процесів у міокарді ізольованого серця щурів, в тому числі, значним пошкодженням і дисфункцією мітохондрій. ГП зменшувало пошкодження м'язових волокон, значно зменшувало кількість структурно змінених мітохондрій обох популяцій з проявом сприятливої мітохондріальної динаміки для компенсації порушень енергетичного обміну.

У щурів з ІР спостерігався сприятливий вплив ВЖД щодо попередження мітохондріальної дисфункції при І/Р. ГП дещо обмежувало набрякові та деструктивні процеси в міокарді, але не спричинювало виразних ефектів на ішемічно-реперфузійне пошкодження мітохондрій у щурів з ІР. Таким чином, ІР при ВЖД супроводжується зростанням мітопротекції в міокарді. При цьому ГП частково втрачає кардіопротективний, в тому числі, мітопротективний, ефект при ІР порівняно з впливом на інтактний міокард.

Результати, викладені у розділі 3.2, опубліковані у наукових працях автора [90, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 103, 106, 107, 108, 109, 110].

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ

При моделюванні ІР було встановлено, що годування щурів лінії Вістар ВЖД протягом 14 днів з 58% ліпідів від загальної калорійності є достатнім для розвитку ІР (див. розділ 3.1.1). При цьому не розвивалося ожиріння, так як не спостерігалось вірогідного приросту маси тіла тварин.

Наші результати співставні з даними інших авторів. Так, Park та ін. показали розвиток ІР в серці мишей лінії C57BL/6 після 10 днів споживання ВЖД, а в периферичних органах (скелетні м'язи і печінка) ІР виникла тільки після 3 тижнів вживання ВЖД. Ці результати свідчать про розвиток ІР в серці незалежно від системного метаболізму глюкози та гіперінсулінемії. Більше того, на цьому етапі ІР можна вважати пристосувальним механізмом, оскільки підвищується окиснення надлишку ліпідів і зменшується глюкози, що забезпечує серце більшою кількістю утвореної АТФ. Проте подальше споживання мишами C57BL/6 ВЖД протягом 20 тижнів характеризувалося дизрегуляцією метаболізму, що проявлялася патологічним ремоделюванням серця з розвитком систолічної дисфункції [111, 112].

Wright та ін. виявили зниження швидкості утилізації глюкози в міокарді через 2 тижні після годування ВЖД самців мишей C57BL/6J. При цьому зберігалася нормальна передача сигналів інсуліну до Akt/PKB і AS-160, але знижувався вміст GLUT4 [113, 114].

За даними Battiprolu та ін., ІР, що виникла внаслідок споживання ВЖД протягом 10 тижнів мишами, характеризувалася пригніченням активності IRS1, зниженням передачі сигналів АКТ і переходом від використання глюкози до ЖК [115, 116].

Для дослідження метаболічного синдрому, і ІР зокрема, використовують як генетично модифіковані тварини, так і дієти різного складу та тривалості (наприклад, збагачених ліпідами, фруктозою, сахарозою та ін.) і їх комбінацію з введенням STZ. Перевагою генетичних моделей є їх використання в ранньому віці, але це можна вважати також і недоліком, оскільки метаболічні порушення,

такі як МС і ЦД 2 типу, зазвичай виникають у зрілому віці. Тому нами була обрана ВЖД-модель, що є більш репрезентативною для захворювання людини [28].

На підтвердження вибору нашої моделі ІР, нещодавні дослідження Wali та ін. відмітили, що ВЖД з 40-60% калорій з жиру широко використовуються для моделювання МС у гризунів, вивчення інсулінової сигналізації та резистентності до інсуліну на молекулярному рівні. Для цього зазвичай використовується додавання свинячого сала чи яловичого жиру, багатих насиченими ЖК. Порівняно з тваринами на стандартному харчуванні, ВЖД викликає помірну гіперглікемію, гіпертригліцеридемію, гіперінсулінемію, стеатоз, ожиріння, дисфункцію та гіпертрофію бета-клітин підшлункової залози, а також резистентність до інсуліну в різних органах [117].

В експериментах переважно використовуються самці, оскільки вони більш схильні до ІР, викликаного ВЖД, ніж самки [188].

На фоні споживання ВЖД ІР розвивається при надмірному надходженні ліпідів з їжею, що сприяє накопиченню їх у жирових депо. У білій жировій тканині надмірне споживання їжі з високим вмістом жиру викликає гіпертрофію цієї тканини та гіперплазію адипоцитів, що у свою чергу, призводить до стимуляції ліполізу і, як наслідок, до підвищення рівня циркулюючих вільних ЖК [119]. Це стимулює збільшення окислення ЖК в мітохондріях, тобто відбувається підвищення катаболізму ліпідів і виробництва енергії через β -окислення та цикл Кребса [3]. В результаті чого відбувається збільшення мітохондріального виробництва вільних радикалів, особливо H_2O_2 , які здатні уповільнити поглинання глюкози шляхом зниження чутливості до інсуліну [120].

За даними літератури для пояснення розвитку ІР висувуються два механізми – за участю ДАГ і керамідів. Так, було показано, що відкладання ліпідів у м'язах та печінці пригнічує передачу сигналів інсуліну через токсичні молекули ДАГ та кераміди. ДАГ, у свою чергу, активують протеїнкіназу С, що в подальшому інгібує передачу сигналів інсуліну через РІЗК-Акт шлях за допомогою фосфорилування залишків серину на IRS. Кераміди, відносячись до сфінголіпідів зі змінною довжиною ланцюга ацильної групи, активують протеїн-фосфатазу 2A, яка

дефосфорилує Akt і відбувається блокування сигналізації інсуліну. Також варто зазначити, що інфільтрація макрофагів у жировій тканині сприяє виділенню ними прозапальних цитокінів, що провокують фосфорилування серинових залишків білків IRS і, таким чином, також пригнічують передачу сигналів інсуліну [117].

Гіперглікемія при постійному впливі сприяє активації шляху біосинтезу гексозаміну (HBP), що призводить до надмірного O-GlcN-ацилювання білків-мішеней і сприяє підвищенню ОС, мітохондріальної дисфункції, посиленню апоптозу і аутофагії, погіршенню механізму відновлення ДНК [9].

Накопичення ЖК викликає мітохондріальну дисфункцію з підвищенням виробництва АФК, особливо супероксид-аніону (O_2^-) та перекису водню (H_2O_2), і подальшим розвитком ОС у кардіоміоцитах. Пошкоджені мітохондрії вивільняють мтДНК, активує шлях cGAS-STING, який, у свою чергу, запускає апоптоз клітин міокарда та запальну відповідь [19]. Високий рівень АФК призводить до роз'єднання ЕТЛ, що провокує зменшення виробництва АТФ у мітохондріях і, зрештою, викликає відкриття пори проникності мітохондрій (mPTP), через що може настати загибель кардіоміоцитів [28]. Також внаслідок гіперглікемії, накопичення AGE та активації їх рецептора AGE активується NF- κ B, що стимулює продукцію цитокінів, які сприяють виникненню і підтримці запалення. Гіперглікемія та гіперінсулінемія порушують RAAS та викликають стрес ендоплазматичного ретикулуму, що сприяє модифікації експресії генів і клітинного фенотипу.

Внаслідок всіх цих змін в серці розвивається фіброз, гіпертрофія, ремоделювання серця та діастолічна дисфункція, які є основними ознаками ДКМП [19].

Отримані нами дані показників помірної глікемії (див. розділ 3.1.1) свідчать про розвиток початкової стадії предіабету, що узгоджується з критеріями American Diabetes Association. [28].

Наші результати підтверджуються дослідженнями Wali та ін., які виявили, що споживання ВЖД викликає лише помірну гіперглікемію і не призводить до розвитку явного ЦД 2 типу [117].

При визначенні ліпідного складу крові (див. розділ 3.1.1) нами було відмічено збільшення ХолЛПВЩ, що, як відомо, являється протекторним і відсутність збільшення інших атерогенних фракцій Хол, особливо ТГ. Ці результати свідчать, що на початковій стадії розвитку ІР компенсаторно-приспосувальні механізми є достатніми.

Це можна пояснити інтенсифікацією окиснення ліпідів у мітохондріях і використання їх в якості субстрату для виробництва енергії. А також з метою захисту від токсичності ЖК відбувається посилення регуляції біогенезу ліпідних крапель, де надлишок ЖК етерифікується і перетворюється на ТГ для подальшого зберігання у ліпідних краплях, що може запобігати ліпотоксичній дисрегуляції мітохондрій. Таким чином, при гострих нехронічних станах підвищений рівень ЖК може бути корисним, оскільки клітинне накопичення ТГ у ліпідних краплях не дозволяє ЖК спричиняти цитотоксичну дію, слугуючи буфером проти ліпотоксичності. Це є особливо сприятливим для функціонування серця при ЦД 2 типу, оскільки воно краще забезпечується енергією [24, 39].

В різних моделях ВЖД характеризувалося змінами ліпідограми [118]. В нашому дослідженні короткотривалий вплив ВЖД викликав тільки збільшення ХолЛПВЩ, тоді як ТГ могли використовуватися для забезпечення енергетичного метаболізму і не зростали на цьому етапі розвитку захворювання.

Отже, згідно з нашими результатами ліпідне навантаження протягом 2 тижнів не призводило до декомпенсації порушень вуглеводного та ліпідного метаболізму, незважаючи на наявність ІР. Така стадія патологічного процесу може розглядатися як ранній етап розвитку захворювання.

Аналізуючи морфометричні дані, отримані нами в процесі експерименту (див. розділ 3.1.2), можна зазначити, що споживання ВЖД протягом 2 тижнів не призводило до ремоделювання серця та його відділів. Також можна зробити зазначити, що зростання маси тіла тварин відбувається більшою мірою, ніж зростання маси серця при споживанні ВЖД. Наші результати демонструють, що на ранніх етапах розвитку ІР не розвивається ремоделювання серця, але це може відбуватися при подальшому розвитку патологічного процесу, як це показують

дослідження на мишах C57BL/6 після вживання ними ВЖД протягом 20 тижнів, в яких показано розвиток ремоделювання серця та систолічну дисфункцію [112].

За даними літератури, як збільшення окиснення ЖК, так і гіперглікемія внаслідок зменшення окиснення глюкози і порушення транспорту її в клітину, перехід на альтернативні шляхи метаболізму субстратів (внаслідок чого утворюються ДАГ та кераміди, AGE та ін.) при ІР сприяють збільшенню утворення АФК, спричиняють розвиток ОС, що порушує роботу ферментів ЕТЛ, погіршує енергетичний метаболізм і викликає мітохондріальну дисфункцію, що може призвести до загибелі кардіоміоцитів і порушення роботи серця [19, 121].

Наші дослідження (див. розділ 3.1.4) підтверджують вищенаведені дані, оскільки при вживанні тваринами ВЖД спостерігалось підвищення рівнів прооксидантних ТБК-АП, що свідчить про розвиток ОС.

Для запобігання ОС у клітинах існують потужні антиоксидантні системи, які підтримують внутрішньоклітинний окисно-відновний баланс. СОД виступає першою лінією захисту, забезпечуючи наступну реакцію: $2O_2^{*-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Далі за допомогою каталази або глутатіонпероксидази відбуваються подальші перетворення на нетоксичні продукти: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ і $2GSN + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + GSSG$, відповідно [43].

При ІР нами було показано пріоритетну активацію системи Глу та меншою мірою каталази, проте СОД не була інтенсивно задіяна в антиоксидантному захисті на момент дослідження. Наші дані співставні з даними Sultana та ін., які вказували інактивацію СОД у діабетичному серці шляхом ацетилювання внаслідок зниження рівня мітохондріальної деацетилази SIRT3 [19, 112].

Також наші результати були підтвержені дослідженнями, висвітленими у статті Rindler та ін., де зазначалося підвищення рівня каталази у серцевих мітохондріях мишей, що перебували на ВЖД. Завдяки низькому зв'язуванню селективна та швидка індукція каталази використовується для захисту від токсичних рівнів H_2O_2 , що дозволяє ферментам PRDX і GPx підтримувати фізіологічні концентрації H_2O_2 , які в подальшому можуть використовуватися для сигналізації. Незважаючи на узгоджене збільшення ендогенної каталази зі

збільшенням виробництва H_2O_2 в мітохондріях, миші, що перебували на ВЖД, були інсулінорезистентними, незважаючи на захисні ефекти надмірної експресії каталази, що спостерігаються у трансгенних мишей mCat [120].

Проте є розходження з дослідженнями ряду інших авторів, як вказували на зниження антиоксидантного захисту при ЦД. Так, Ansley та ін., спостерігали зниження активності як ферментних, так і неферментних антиоксидантів у еритроцитах внаслідок гіперглікемії та активації глікації [121]. Federico та ін., також показали зниження рівня Глу [28]. А дослідження Bonomini та ін., відзначили зниження рівня мРНК СОД, каталази та глутатіонпероксидази [123].

Ці відмінності можна пояснити тим, що при ЦД відбувається виснаження компенсаторних антиоксидантних систем і порушення їх роботи, в той час як при початковій стадії ІР вони, навпаки, активуються. Так, нами було відмічено посилення антиоксидантного захисту при споживанні тваринами ВЖД на дію ГП.

Ми спостерігали такі основні порушення ультраструктури міокарда при ІР (див. розділ 3.1.6), як ендотеліальна і саркоплазматична дисфункція, набряк ендотелію, збільшення обох субпопуляції мітохондрій і рибосом. А при ГП виникали ушкодження міофібрил, але водночас були ознаки мітофагії та утворення нових мітохондрій. В той же час на фоні ВЖД ГП зберігало ушкоджуючий вплив на міофібрили, але зменшувалася кількість пошкоджених мітохондрій, зокрема зростала ІМФ субпопуляція, що може вказувати на мітопротекторну дію ГП при ІР.

У нечисленних дослідженнях ГП, зокрема на мишах, ультраструктура міокарда і зміни мітохондріального апарату не вивчалися [63, 124].

Переважає більшість досліджень змін мітохондрій та ультраструктури міокарда проведена при ЦД. Так, Boardman та ін. виявили фрагментацію мітохондрій при ЦД та збільшення розмірів ліпідних крапель, але зі зменшенням їхньої кількості [24]. Galloway та ін. також відзначили фрагментацію мітохондрій при ЦД і руйнування крист, набряк цих органел [1, 125]. Дослідження проведені Montaigne та ін. пов'язали фрагментацію мітохондрій при ЦД зі зниженням

експресії білка Mfn1, що бере участь у процесах мітохондріальної динаміки. Також ці автори зазначили зменшення розміру даних органел [28].

На ранніх стадіях МЗ, таких як предіабет, Federico та ін. виявили менші розміри мітохондрій та їхню більш сферичну форму порівняно з контрольними тваринами, що вказує на інтенсифікацію процесів поділу [28].

Kassab та ін. повідомили про посилення мітохондріального поділу в міокарді хворих на діабет [1, 126].

Незважаючи на те, що у фізіологічних умовах процеси поділу/злиття мітохондрій у дорослих кардіоміоцитах нечасті, але Galloway та ін. відмітили збільшення мітохондріальної динаміки при МЗ [28, 126].

В той час як у своїх дослідженнях на моделях ВЖД із STZ Dabkowski та ін. показали незбалансовану мітохондріальну динаміку щодо процесів поділу, оскільки щільність серцевих мітохондрій була збільшеною, але, разом з тим, спостерігалась зменшена площа. Dikalov та ін. у своїй публікації зазначили, що на такій же діабетичній моделі показано зменшення розміру крист в ІМФ мітохондріях [28].

Sparks та ін. відзначив, що не тільки чисельність мітохондрій знижується у мишей C57Bl/6, яких годували ВЖД, а й експресія генів, пов'язаних з мітохондріальною функцією, що може призвести до діастолічної та/або систолічної дисфункції [3, 127].

Як свідчить аналіз сучасних літературних даних, механізми розвитку ДКМП, в тому числі, обумовлені хронічною гіперглікемією та ІР, залишаються недостатньо вивченими і потребують дослідження [19]. На підставі цього аналізу, можна зробити висновок, що одержані нами результати про розвиток ранніх стадій ІР в міокарді, є новими і висвітлюють патогенез ураження міокарду при ІР та компенсаторно-приспосувальні механізми, які розвиваються у мітохондріях серця.

При дослідженні функцій мітохондрій нами встановлено (див. розділ 3.1.3), що ВЖД призводила до пригнічення мітохондріального дихання, особливо ОФ,

зміни використання енергетичних субстратів в бік зростання окиснення пальмітоїлу, зменшення використання глутамату і сукцинату [28].

ГП стимулювало окиснення пірувату, що вказує на інтенсифікацію гліколізу та викликало перебудову I НАД-залежного комплексу ЕТЛ. А при дії ГП при IP зростало окиснення і пальмітоїлу, і пірувату, але спостерігалася дисфункція I комплексу при збереженій роботі II комплексу ЕТЛ. При впливі ГП мітохондріальна функція практично не досліджувалася. Таким чином одержані нами результати про мітохондріальну дисфункцію при ГП є новими.

Дані літератури про вплив ВЖД на функцію мітохондрій суперечливі, що можна віднести до різних стадій розвитку захворювання [28]. Але ці дані не становлять цілісної картини участі мітохондрій в компенсації порушень на ранньому етапі IP і в патогенезі розвитку ЦД 2 типу і МС.

Отримані нами дані свідчать про сприятливий вплив як ВЖД, так і ГП на скоротливу функцію серця (див. розділ 3.2.1). Але при впливі ГП на тварин з ВЖД його ефект втрачався. Але вплив ВЖД стимулював виникнення аритмій, при цьому ГП зменшувало їхню частоту. Наші дані частково відрізняються від даних інших авторів, які визначали меншу частоту тяжких аритмій після ГП [9].

Так, дослідження, висвітлені у публікації Sack та ін., вказали на те, що миші db/db (з дефіцитом лептинових рецепторів, що призводить до розвитку ЦД і ожиріння) були більш сприйнятливі до серцевої ішемії, на що вказувало відновлення скоротливої функції в постішемичному періоді. Паралельно у тварин була знижена здатність використовувати глюкозу в цих умовах при дефіциті кисню. Це призводило до більшої частоти розвитку серцевої недостатності та підвищеної смертності у відповідь на хронічну ішемію [128]. При аналізі даних, одержаних від нокаутуваних тварин, слід брати до уваги, що у них вже активовані захисні механізми, але результати щодо підтримки скоротливої функції співпадають з нашими даними при вживанні ВЖД.

Незважаючи на те, що ЦД викликає значні зміни в структурі та функції кардіоміоцитів, його вплив запускає компенсаторні механізми. Так, короточасний вплив на серце високої концентрації глюкози або ЦД мали

позитивний ефект проти ішемічного інсульту. Докази компенсаторного ефекту при ЦД були представлені у дослідженні, яке вказувало на краще відновлення скорочувальної здатності діабетичного серця після I/R [24].

Також було показано, що, подібно до ліпотоксичності в діабетичному серці, надмірне накопичення ліпідів знижує серцеву функцію, що призводить до індукції фібриляції шлуночків у пацієнтів і на тваринних моделях розладів окиснення довголанцюгових жирних кислот [24].

Відомо, що ішемія міокарда та/або прекодиціювання зменшують тяжкість ішемічно-реперфузійного ушкодження шляхом активації шляхів виживання клітин і попередження вільнорадикальних реакцій у міокарді. Втрата діабетичним міокардом реактивності до фізичних або фармакологічних індукторів прекодиціювання була пояснена експериментально на основі порушення проведення сигналу виживання та попередження відкривання mPTP [121].

Таким чином, є переконливі дані про те, що гіперглікемія та діабет можуть послабити кардіопротекторну дію прекодиціювання, але в клінічних умовах це не було продемонстровано [60, 129]. Картина ще більше ускладнюється гетерогенністю використовуваних тваринних моделей, що може пояснити деякі неоднорідні результати. Отже, на доповнення даних досліджень тяжких метаболічних порушень при діабеті, нами одержано нові дані, що вже на ранніх етапах розвитку ІР кардіопротективні ефекти втрачаються.

Відомо, що I/R викликає ОС, а прекодиціювання його обмежує. Ansley та ін. показали, що I/R стимулює утворення АКФ з багатьох джерел, як пошкодження та роз'єднання транспорту електронів у мітохондріях, НАДФН-оксидаза, неспряжена синтаза оксиду азоту (NOS), ксантинооксидаза, цитохром P450-монооксигеназа та циклооксигеназа. Водночас I/R виснажує клітинну систему антиоксидантного захисту через нижчу активність ендогенних ферментів СОД, глутатіонпероксидази та каталази [121].

Ansley та ін. відмітили, що ішемія та рання реперфузія призводять до низького рН і гіпоксичних умов, які сприяють вивільненню катіонів заліза (Fe^{2+}) з металопротеїназ. У присутності яких H_2O_2 , що утворився внаслідок дисмутації

$O_2^{\cdot-}$ СОД, більш імовірно буде перетворений через реакцію Фентона в OH^{\cdot} замість того, щоб деактивуватися каталазою або GPx [121].

Умови ранньої реперфузії можуть бути основною детермінантою пошкодження тканин. Реперфузія стимулює активність НАДФН-оксидази, цитохрому P450 і циклооксигенази для збільшення та прискорення виробництва вільних радикалів. Парадоксально, але повторна оксигенація тканин накопиченими окисними субстратами роз'єднує ЕТЛ, що призводить до утворення АФК [121].

Масштабна генерація АФК і виснажені запаси енергії викликають перехід мітохондріальної проникності (mPT), що призводить до утворення та відкриття пор (mPTP) на внутрішній мітохондріальній мембрані, що дозволяє проходити молекулам розміром менше 1,5 кДа. mPTP розсіює потенціал мітохондріальної мембрани ($\Delta\Psi_m$), надаючи протонам альтернативний шлях до матриці. Клітинні запаси АТФ ще більше виснажуються. Молекули більше 1,5 кДа створюють колоїдно-осмотичний тиск, який спричиняє набухання мітохондріального матриксу. Цілісність зовнішньої мембрани порушується, цитохром c вивільняється в цитоплазму для ініціації проапоптозних сигналів. Тяжкість і тривалість mPT безпосередньо впливають на підтримку запасів АТФ і цілісність клітин. Якщо mPT тимчасовий, клітина може відновитися. Якщо mPT продовжується і виснаження АТФ є серйозним, виникає некроз. З цією метою кількість мітохондрій, які піддаються mPT, корелює з ймовірністю втрати кардіоміоцитів. Тяжкість mPT пропорційна функціональному відновленню в моделі ізольованого серця. Загалом кислий стан під час ішемії пригнічує mPT. Коли рН нормалізується під час ранньої реперфузії, mPT посилюється [121].

У діабетичному серці потік глюкози також активує альдозоредуктазу, сорбіталдегідрогеназу та перетворення глюкози на фруктозу, щоб сприяти ОС через поліоловий шлях. I/R активує індуковане альдозоредуктазою виснаження внутрішньоклітинного NADPH, кофактора, необхідного для активності GR у серці. Рівень антиоксиданту GSH виснажується, що робить серце вразливим до пошкоджень, опосередкованих окисниками.

Повідомляється, що ОС, опосередкований альдозоредуктазою, посилює відкриття mPTP, що сприяє скоротливій дисфункції міокарда та пошкодженню тканин у серцях щурів з I/R [121].

Згідно з нашими даними, на ранніх етапах ІР посилює ОС, але не при І/Р (див. розділ 3.2.3). Його компенсація головним чином досягається за участі фермента каталази. ГП сприяє зменшенню рівня ОС в основному за рахунок системи Глу, а при його впливі в умовах ІР активуються і Глу, і каталаза, і СОД. Таким чином, нами отримано нові дані про особливості розвитку та компенсації ОС в реперфузованому міокарді при ІР та ГП.

Наші дані співпадають з даними інших авторів щодо зменшення розміру інфаркту після ГП [9]. ІР не впливала на площу післяішемічного ураження, проте в літературі зустрічаються неоднозначні дані щодо впливу метаболічних порушень на розмір інфаркту. Так, за даними Ренна та ін., більшість досліджень повідомляли про збільшення або відсутність змін у розмірі інфаркту в тварин з ЦД 2 типу, а меншість – про його зменшення. Збільшення площі ураження при ЦД 2 типу автори пояснюють тим, що серця *in vivo* піддаються впливу набагато вищих рівнів глюкози та вільних ЖК, ніж ізольовані серця, які були перфузовані розчином з нормальним рівнем глюкози (насправді, можна припускати, що у розчині були відсутні альтернативні енергетичні субстрати); а зменшення – збереженою сигналізацією інсуліну та активацією захисних сигнальних шляхів на ранньому етапі розвитку ЦД та ожиріння [60].

Показано, що некроз кардіоміоцитів значно збільшується в біопсії міокарда шлуночків пацієнтів з діабетом, підтверджуючи первинне порушення толерантності міокарда до ішемії та реперфузійного пошкодження [121]. Це можна пояснити різною тяжкістю цих зрушень – у нас початкова стадія ІР не впливала на розмір інфаркту (див. розділ 3.2.2), в той час як ЦД призводив до зменшення толерантності міокарда до ішемії і збільшення розвитку частоти серцевої недостатності після перенесеного інфаркту, що проявлялося у збільшенні смертності після інфаркту на фоні ЦД у 2-4 рази [121, 128].

Підсумовуючи ці дані, можна констатувати, що збереження чутливості клітин до інсуліну є одним з основних факторів, які визначають розмір інфаркту. Закономірно, що в серцях щурів з ІР розмір інфаркту не зменшувався, але ГП позитивно впливало на цей показник, можливо за рахунок зростання інтенсивності гліколізу.

Нами вперше описано зміни мітохондріального апарату міокарда при ІР і ГП, а саме кількісні і якісні зміни різних субпопуляції мітохондрій в міокарді (див. розділ 3.2.5). І/Р викликало набряк, деструкцію міофібрил, перикапілярного простору, незначно ендотелію, пошкодження обох субпопуляцій мітохондрій. В той час, як ГП зменшувало пошкодження міофібрил і мітохондрій, викликало збільшення чисельності мітохондрій, активувало їхню динаміку, мітоптоз, тобто чинило протекторну дію на ультраструктуру міокарда, ВЖД стимулювало розміщення мітохондрій навколо ліпідних крапель, збільшення рибосом, попереджувало набряк СС мітохондрій, тобто також виступало у ролі мітопротектора. А при поєднанні ГП і ВЖД в реперфузованих серцях вплив ГП частково втрачався, хоча відмічалось покращення будови мітохондрій, особливо ІМФ, але погіршення міофібрил, що характерно для гіпоксії.

Ці зміни можуть бути наслідком розвитку мітохондріальної дисфункції при вживанні ВЖД, які компенсуються шляхом зростання біогенезу, кількості мітохондрій та мітохондріальної динаміки. Водночас структурно пошкоджені мітохондрії видаляються шляхом мітофагії і мітоптозу.

В літературі ці показники недостатньо охарактеризовано [9]. Так, показано, що ішемічне пошкодження прогресує швидше у СС мітохондріях [25]. Це можна пояснити більшою сприйнятливістю цієї субпопуляції до І/Р-індукованого ОС через близькість до клітинної мембрани, де іонний дисбаланс і виробництво АКФ більш виражені під час реперфузії. Описано пригнічення активності цитохромоксидази в СС мітохондріях після 45 хвилин ішемії, що впливало на ОФ, а також зниження рівня кардіоліпіну виключно в цій субпопуляції мітохондрій, яке було пов'язане зі зниженим ОФ, що свідчить про зв'язок із дисфункцією ЕТЛ [25].

З іншого боку, на ІМФ мітохондрії, які в основному забезпечують виробництво АТФ, необхідного для скоротливої функції, більше впливають зміни внутрішньоклітинних рівнів кальцію при І/Р ушкодженні. Ця структурна та функціональна неоднорідність свідчить про різні порогові значення для пошкодження та відновлення у відповідь на І/Р у різних мітохондріальних популяціях в серцевих клітинах, що впливає на загальну стійкість або сприйнятливність серця до такого стресу [25].

В нашій роботі було показано пошкодження обох субпопуляцій мітохондрій, що не суперечить вищенаведеним результатам, оскільки при І/Р відбуваються порушення як на позаклітинному, так і на внутрішньоклітинному рівнях, що призводять до пошкодження мітохондрій різними шляхами.

ГП чинило мітопротекторну дію, сприяючи зменшенню пошкодження ІМФ мітохондрій, але в той же час спостерігалось ураження міофібрил [9]. В публікації Ansley та ін. зазначено, що діабетичний міокард і судинна система є більш вразливими до ішемії та реперфузійного пошкодження, що включає структурні зміни саркомерів кардіоміоцитів, мітохондрій і супутньої інтерстиціальної та мікросудинної ультраструктури внаслідок дії прооксидантів [121]. Наші дані розходяться з цими результатами, оскільки було виявлено сприятливий вплив при ІР, як більш ранній стадії метаболічного захворювання, щодо попередження мітохондріальної дисфункції.

Це можна пояснити, знову ж таки, тим, що на початкових стадіях ЦД підвищений рівень ліпідів може чинити сприятливу дію за рахунок збільшення кількості ліпідних крапель в клітинах і покращення енергетичного забезпечення міокарда [28]. Але при ІР ГП частково втрачало кардіопротекторний ефект, в тому числі на мітохондрії.

Щодо рівня експресії PGC-1 α , нами було виявлено переважання рівня цього білка в ПШ на противагу ЛШ (див. розділ 3.1.5). Споживання ВЖД стимулювало його зростання лише у ЛШ, а ГП не впливало на рівень експресії. Проте вплив ГП на цих тварин призводив до збільшення рівня PGC-1 α у ПШ.

При моделюванні STZ-індукованого діабету у щурів було показано зростання рівня експресії PGC1 α . Автори припустили, що H₂O₂ і оксид азоту відповідають за активацію PGC1 α . Подібні результати були показані раніше Finck та ін., де PPAR γ та PGC1 α були збільшені на цій моделі [28]. Навпаки, Yan та ін. описали зниження функції PGC-1 α в серці у мишей ob/ob внаслідок ацетилювання AMPK, яке активується дефосфорилюванням адипонектину [28].

Використовуючи ВЖД у моделюванні ЦД 2 типу, було виявлено, що рівні експресії мтДНК, PGC-1 α та NRF були знижені [28]. Той самий результат підтвердили Duncan та ін. на моделі IP [28].

Оскільки кіназа AMPK активує PGC-1 α через фосфорилювання, а кінази Akt, GSK-3 β та S6K1 інгібують останню, ефекти гіпоксії на активність PGC-1 α можуть варіюватися в залежності від активації тих чи інших сигнальних шляхів у відповідь на нестачу кисню. Помірний вплив гіпоксії, який застосовується під час ГП, не призводить до активації AMPK. У той же час, встановлено, що застосований режим ГП посилює експресію та активацію цитопротективної кінази Akt у міокарді [9], яка є інгібіторною щодо PGC-1 α . З огляду на ці міркування, ГП у інтактних тварин не повинно викликати значної активації PGC-1 α .

Натомість, при IP виявлене зростання експресії цього білка вказує на зміну співвідношення цих регуляторів у бік зростання впливу AMPK. Це може свідчити, що комбінація IP та ГП посилює енергетичний дефіцит в міокарді і підвищує концентрацію АДФ, яка активує AMPK [130]. Активація AMPK збільшує рівень експресії PGC-1 α і викликає його фосфорилювання, в підсумку покращуючи функцію мітохондрій, енергетичний метаболізм і зменшуючи IP [131]. Таким чином, зростання рівня експресії PGC-1 α при ВЖД+ГП є компенсаторним механізмом для покращення енергетичного метаболізму міокарда і обмеження IP.

Фібриляція передсердь - найпоширеніша аритмія, яка частково може бути наслідком метаболічного стресу. За останніми даними, дефіцит AMPK призводить до гальмування шляху PGC1- α /PPAR α у передсердях та широкого метаболічного перепрограмування з окиснення жирних кислот в бік окиснення пірувату, що може сприяти ремоделюванню передсердь та аритмії [132]. Отже, PGC1- α може

опосередковувати схильність до брадикардії і зменшення випадків фібриляції при ішемії-реперфузії у щурів з ІР (див. розділ 3.2.1).

Останні дослідження показали, що зростання ЛПВЩ не тільки має антиатерогенну функцію, але й покращує метаболізм глюкози. Введення ЛПВЩ підвищувало мітохондріальну функцію *in vitro* та призводило до зростання експресії PGC1 α у скелетних м'язах мишей [133]. Оскільки в наших дослідженнях при ІР спостерігалось зростання ХолЛПВЩ, це може бути протективним механізмом для компенсації порушення вуглеводного метаболізму і водночас стимулювати ріст експресії PGC1 α у міокарді, який ми спостерігали.

При оцінці одержаних показників мітохондріального дихання звертає на себе увагу зростання V4 при ІР, яке може бути наслідком ЛПВЩ-обумовленої стимуляції PGC1 α , як це спостерігалось при введенні мишам ЛПВЩ [133]. Однак паралельного зростання V3 порівняно з контролем не відбувалося, це може свідчити, що при ІР розвивалося пригнічення V3, яке відновлювалося до контрольних значень завдяки зростанню ЛПВЩ і стимуляції PGC1 α . Однак в умовах ВЖД+ГП зростали обидва показники V3 і V4, що властиво зростанню дії PGC1 α . Отже, останній механізм є компенсаторним, який підтримує ОФ в умовах ІР.

Відомо, що у відповідь на стрес відбувається ядерна деградація PGC-1 α [134], це пояснює зниження експресії цього білка в міокарді після ішемії-реперфузії в нашому експерименті. Такі ж ефекти описано при дії пероксиду водню або при голодуванні [134]. За нашими даними, відсутність постреперфузійного зниження рівня експресії PGC-1 α у групі ВЖД супроводжувалася меншими проявами окисного стресу в цій групі, що вказує на залежність цих параметрів при ІР. Цікаво також, що зростання калорійності раціону при ВЖД підвищувало рівень експресії PGC-1 α в ЛШ серця, тоді як у ПШ для цього була потрібна комбінована дія ВЖД+ГП.

PGC-1 α відіграє ключову роль у координації окиснення внутрішньоклітинних жирних кислот із ремоделюванням мітохондрій. Також є свідчення, що зростання експресії PGC-1 α підвищує мітохондріальний біогенез

шляхом сприяння транскрипції мітохондріальних генів [135]. Зростання біогенезу мітохондрій ми спостерігали у щурів з ІР і ще більшою мірою у тварин групи ВЖД+ГП із кращим збереженням структури мітохондрій при гіпоксичному впливі та ішемічному ураженні, що вказує на PGC-1 α –опосередкований захисний ефект щодо компенсації мітохондріальної дисфункції при ІР і підтримання цілісності мітохондрій при гіпоксії або ішемії.

NO може діяти як ключовий регулятор експресії PGC-1 α , ці механізми можуть спільно регулювати мітохондріальний і ліпідний метаболізм і скорочення м'язів, однак зв'язок між NOS і PGC-1 α в скелетних м'язах і міокарді залишається недостатньо вивченим [136]. Добре відомо, що NO є медіатором прекодиціонування і опосередковує кардіопротективні ефекти при ГП [9]. З огляду на ці відомості, можна припустити, що NO-залежні механізми опосередковують функціональну і структурну кардіопротекцію при ГП, тоді як при ІР ці механізми і їх взаємодія з PGC-1 α перебудовуються в бік переважно метаболічної регуляції останнього. Внаслідок цього функціональна кардіопротекція зменшується і діяльність серця репрограмується в бік обмеження скоротливої активності і збереження енергетичних ресурсів, за рахунок чого структурна кардіопротекція (зменшення розміру інфаркта) підтримується більшою мірою. Отже, в серцях з ІР з напруженим енергетичним метаболізмом ми спостерігали кращу збереженість мітохондріального апарату, але його функція, як і постішемичне відновлення функції серця, були знижені.

Аналіз одержаних результатів дозволяє зробити висновки, що мітохондріальні механізми, значною мірою опосередковані PGC-1 α , відіграють значну роль у протекції міокарда при ІР. Застосування ГП при ІР демонструє у міокарді захисні ефекти більшою мірою щодо структурної, ніж функціональної або метаболічної протекції, при цьому роль мітохондріальних механізмів у захисті міокарду від ішемічного або гіпоксичного пошкодження зростає.

Вищезазначене можна узагальнити у вигляді схеми (рис. 4.1):

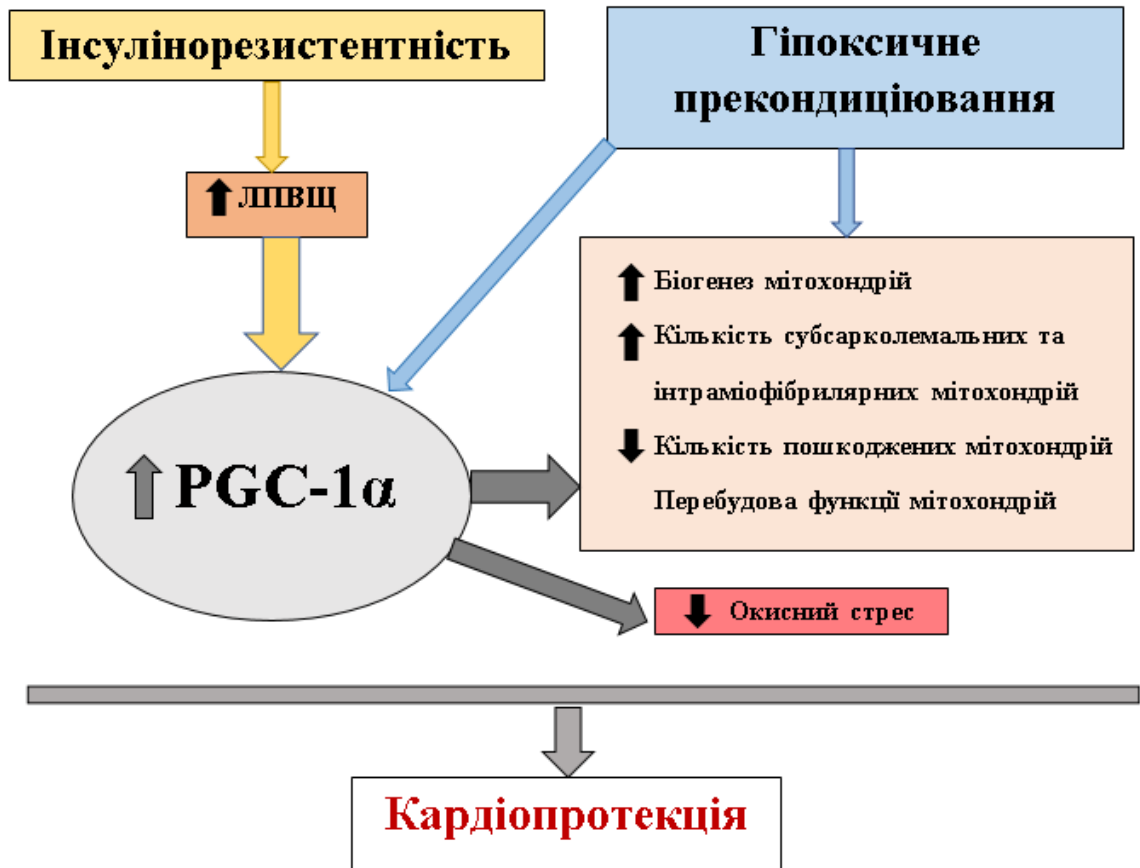


Рис. 4.1. Схема участі PGC-1 α -залежних мітохондріальних механізмів у міокарді у розвитку кардіопротекції при впливі інсулінорезистентності та гіпоксичного преко́ндиціювання.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення та нове вирішення наукового завдання встановлення мітохондріальних механізмів кардіопротекції при інсулінорезистентності і впливі гіпоксичного прекондиціонування на щурів, яке проведено на основі визначення морфологічних, метаболічних та молекулярних змін у міокарді при моделюванні інсулінорезистентності у щурів, впливі на них гіпоксичного прекондиціонування та дослідженні ефектів кардіопротекції при ішемії-реперфузії ізольованого серця, а також визначенні ролі білка PGC-1 α у патогенетичних механізмах.

1. При інсулінорезистентності відбувалося зниження показників мітохондріального дихання за умов окиснення ФАД і НАД-залежних субстратів, особливо, глутамату (на 33%). Вплив гіпоксичного прекондиціонування викликав збільшення V_3 при окисненні пірувату на 76% та зміну співвідношення в окисненні НАД-залежних субстратів глутамату і пальмітоїлу в бік останнього. Зменшення V_3/V_4 свідчить про зниження ефективності окисного фосфорилування при використанні всіх НАД-залежних субстратів у цій групі. Водночас відбувалася активація гліколізу і відзначалася компенсаторна стимуляція енергетичного метаболізму за рахунок окиснення пірувату. Одержані показники свідчать про зростання використання ліпідів мітохондріями як енергетичного субстрату, особливо при гіпоксичному впливі.

2. У щурів з ІР відбувалася активація вільнорадикальних процесів у міокарді зі зростанням ТБК-АП на 17%, водночас посилювались компенсаторні механізми, за рахунок яких обмежувалася прооксидантна відповідь на гіпоксичне прекондиціонування, яка розвивалася в інтактному міокарді. В якості основної компенсаторної ланки в міокарді була задіяна система глутатіону.

3. У міокарді інсулінорезистентних тварин спостерігалось кількісне зростання всіх субпопуляцій мітохондрій та активація їх внутріклітинних зв'язків з іншими органелами. Гіпоксичне прекондиціонування призводило до активації мітохондріального апарату міокарду та енергетичного метаболізму, зростання

мітохондріальної динаміки з елімінацією ушкоджених органел шляхом мітофагії і біогенезом нових мітохондрій на тлі зменшення мітохондріальної та ендотеліальної дисфункції, однак виявлялися ознаки пошкодження міофібрил.

4. При постішемичній реперфузії ізольованого серця щурів з інсулінорезистентністю виявлено збереження скоротливої функції серця, зокрема, СТЛШ і ТрЛШ, без змін розміру інфаркту. Протективний ефект гіпоксичного прекондиціонування на скоротливу функцію серця та розвиток тяжких аритмій не спостерігався при інсулінорезистентності, проте гіпоксичне прекондиціонування сприяло зменшенню розміру інфаркту на 64,6%.

5. Прояви окисного стресу у серцях з інсулінорезистентністю після ішемії-реперфузії зменшувалися за накопиченням ТБК-АП на 31%, що забезпечувалося активованими у цих щурів компенсаторними механізмами системи глутатіону та каталазою. Гіпоксичне прекондиціонування попереджувало розвиток окисного стресу на 38,5% у контролі, але не впливало на показники у щурів з інсулінорезистентністю. На відміну від інших груп, у серцях з інсулінорезистентністю у процесах антиоксидантного захисту більш збереженою залишалася система глутатіону і до нього включалася система СОД.

6. У щурів з інсулінорезистентністю спостерігався сприятливий вплив ВЖД щодо попередження пошкодження мітохондрій та проявів їх дисфункції при ішемії-реперфузії. Гіпоксичне прекондиціонування обмежувало набрякові та деструктивні процеси в міокарді, але не спричинювало виразних ефектів на ішемічно-реперфузійне пошкодження мітохондрій у щурів з інсулінорезистентністю. Інсулінорезистентність при високожировій дієті супроводжується зростанням мітопротекції в міокарді. При цьому гіпоксичне прекондиціонування частково втрачає кардіопротективний, в тому числі, мітопротективний, ефект при інсулінорезистентності порівняно з впливом на інтактний міокард.

7. Встановлено, що активація кардіопротективних PGC-1 α -опосередкованих механізмів, а саме, стимуляції мітохондріального біогенезу, переходу мітохондрій на вживання інших енергетичних субстратів, обмеження

окисного стресу, забезпечувалася при інсулінорезистентності та впливі гіпоксії зростанням рівня експресії цього білка у міокарді (на 32% у лівому шлуночку), а також збільшенням вмісту активатора PGC-1 α ЛПВЩ у периферичній крові. При цьому гіпоксичне прекодиціювання збільшувало рівень експресії PGC-1 у правому шлуночку (у 1,9 рази), а при ішемії-реперфузії спостерігалось зменшення цих показників. Це свідчить, що інсулінорезистентність сприяла інтенсифікації PGC-1-залежних мітохондріальних механізмів протекції від ішемічного пошкодження в міокарді.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:

1. Li J, Li J, Chen Y, Hu W, Gong X, Qiu H, Chen H, Xin Y, Li H. The Role of Mitochondria in Metabolic Syndrome-Associated Cardiomyopathy. *Oxid Med Cell Longev*. 2022 Jun 23;2022:9196232. doi: 10.1155/2022/9196232.
2. Zheng H, Zhu H, Liu X, Huang X, Huang A, Huang Y. Mitophagy in Diabetic Cardiomyopathy: Roles and Mechanisms. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Sep 27;9:750382. doi: 10.3389/fcell.2021.750382.
3. Kyriazis ID, Vassi E, Alvanou M, Angelakis C, Skaperda Z, Tekos F, Garikipati VNS, Spandidos DA, Kouretas D. The impact of diet upon mitochondrial physiology (Review). *Int J Mol Med*. 2022 Nov;50(5):135. doi: 10.3892/ijmm.2022.5191.
4. Qian L, Zhu Y, Deng C, Liang Z, Chen J, Chen Y, Wang X, Liu Y, Tian Y, Yang Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) family in physiological and pathophysiological process and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Mar 1;9(1):50. doi: 10.1038/s41392-024-01756-w.
5. Sabouny R, Shutt TE. Reciprocal Regulation of Mitochondrial Fission and Fusion. *Trends Biochem Sci*. 2020 Jul;45(7):564-577. doi: 10.1016/j.tibs.2020.03.009.
6. Venditti P, Di Meo S. The Role of Reactive Oxygen Species in the Life Cycle of the Mitochondrion. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 21;21(6):2173. doi: 10.3390/ijms21062173.
7. Actis Dato V, Lange S, Cho Y. Metabolic Flexibility of the Heart: The Role of Fatty Acid Metabolism in Health, Heart Failure, and Cardiometabolic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2024 Jan 19;25(2):1211. doi: 10.3390/ijms25021211.
8. Sjögren RJO, Rizo-Roca D, Chibalin AV, Chorell E, Furrer R, Katayama S, Harada J, Karlsson HKR, Handschin C, Moritz T, Krook A, Näslund E, Zierath JR. Branched-chain amino acid metabolism is regulated by ERR α in primary human myotubes and is further impaired by glucose loading in type

- 2 diabetes. *Diabetologia*. 2021 Sep;64(9):2077-2091. doi: 10.1007/s00125-021-05481-9.
9. Портниченко А. Г. Прекондиціювання міокарда. Нові підходи та молекулярні механізми: монографія / Портниченко А. Г. та ін., - Київ: Знання України, 2019. 271 с.
 10. Bolli R. Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Jan;292(1):H19-27. doi: 10.1152/ajpheart.00712.2006.
 11. Caturano A. Cardiovascular and Metabolic Disease: New Treatments and Future Directions 2.0. *Biomedicines*. 2024 Jun 18;12(6):1356. doi: 10.3390/biomedicines12061356.
 12. Jung SE, Kim SW, Choi JW. Exploring Cardiac Exosomal RNAs of Acute Myocardial Infarction. *Biomedicines*. 2024 Feb 14;12(2):430. doi: 10.3390/biomedicines12020430.
 13. Federica Fogacci, Serra İlayda Yerlitaş, Giovannini M, Gökmen Zararsız, Paolo Lido, Borghi C, et al. Sex X Time Interactions in Lp(a) and LDL-C Response to Evolocumab. *Biomedicines*. 2023 Dec 11;11(12):3271–1. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11123271>.
 14. Cardiovascular diseases kill 10 000 people in the WHO European Region every day, with men dying more frequently than women. *Who.int*. 2021. <https://doi.org/1010318.tmb-1200v>.
 15. Giangregorio F, Mosconi E, Debellis MG, Provini S, Esposito C, Matteo Garolfi, et al. A Systematic Review of Metabolic Syndrome: Key Correlated Pathologies and Non-Invasive Diagnostic Approaches. *Journal of Clinical Medicine*. 2024 Oct 2;13(19):5880–0. <https://doi.org/10.3390/jcm13195880>.
 16. Fahed G, Aoun L, Bou Zerdan M, Allam S, Bou Zerdan M, Bouferraa Y, Assi HI. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 12;23(2):786. doi: 10.3390/ijms23020786.

17. Nirengi S, Peres Valgas da Silva C, Stanford KI. Disruption of energy utilization in diabetic cardiomyopathy; a mini review. *Curr Opin Pharmacol.* 2020 Oct;54:82-90. doi: 10.1016/j.coph.2020.08.015.
18. Giardinelli S, Meliota G, Mentino D, D'Amato G, Faienza MF. Molecular Basis of Cardiomyopathies in Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci.* 2024 Jul 29;25(15):8280. doi: 10.3390/ijms25158280.
19. Lopaschuk GD, Karwi QG, Tian R, Wende AR, Abel ED. Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure. *Circ Res.* 2021 May 14;128(10):1487-1513. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318241.
20. Kolwicz SC Jr, Purohit S, Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res.* 2013 Aug 16;113(5):603-16. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.302095.
21. Wu Y, Wang Y, Zhang J, Zhang R, Zhao L, Ren H, Zou Y, Wang T, Wang J, Zhao Y, Qin C, Xu H, Li L, Chai Z, Cooper ME, Tong N, Liu F. Early-onset of type 2 diabetes mellitus is a risk factor for diabetic nephropathy progression: a biopsy-based study. *Aging (Albany NY).* 2021 Mar 3;13(6):8146-8154. doi: 10.18632/aging.202624.
22. Hayden MR. Overview and New Insights into the Metabolic Syndrome: Risk Factors and Emerging Variables in the Development of Type 2 Diabetes and Cerebrocardiovascular Disease. *Medicina (Kaunas).* 2023 Mar 13;59(3):561. doi: 10.3390/medicina59030561.
23. Boardman NT, Trani G, Scalabrin M, Romanello V, Wüst RCI. Intracellular to Interorgan Mitochondrial Communication in Striated Muscle in Health and Disease. *Endocr Rev.* 2023 Jul 11;44(4):668-692. doi: 10.1210/endrev/bnad004.
24. Nakamura E, Aoki T, Endo Y, Kazmi J, Hagiwara J, Kuschner CE, Yin T, Kim J, Becker LB, Hayashida K. Organ-Specific Mitochondrial Alterations Following Ischemia-Reperfusion Injury in Post-Cardiac Arrest Syndrome: A Comprehensive Review. *Life (Basel).* 2024 Apr 5;14(4):477. doi: 10.3390/life14040477.

25. Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol.* 2020 Oct;37:101674. doi: 10.1016/j.redox.2020.101674.
26. Dobrin JS, Lebeche D. Diabetic cardiomyopathy: signaling defects and therapeutic approaches. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2010 Mar;8(3):373-91. doi: 10.1586/erc.10.17.
27. Federico M, De la Fuente S, Palomeque J, Sheu SS. The role of mitochondria in metabolic disease: a special emphasis on heart dysfunction. *J Physiol.* 2021 Jul;599(14):3477-3493. doi: 10.1113/JP279376.
28. Dikalov S, Panov A, Dikalova A. Critical Role of Mitochondrial Fatty Acid Metabolism in Normal Cell Function and Pathological Conditions. *Int J Mol Sci.* 2024 Jun 12;25(12):6498. doi: 10.3390/ijms25126498.
29. Li Z, Zhao H, Wang J. Metabolism and Chronic Inflammation: The Links Between Chronic Heart Failure and Comorbidities. *Front Cardiovasc Med.* 2021 May 5;8:650278. doi: 10.3389/fcvm.2021.650278.
30. Panov AV, Mayorov VI, Dikalova AE, Dikalov SI. Long-Chain and Medium-Chain Fatty Acids in Energy Metabolism of Murine Kidney Mitochondria. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 26;24(1):379. doi: 10.3390/ijms24010379.
31. Panov A, Mayorov VI, Dikalov S. Metabolic Syndrome and β -Oxidation of Long-Chain Fatty Acids in the Brain, Heart, and Kidney Mitochondria. *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 6;23(7):4047. doi: 10.3390/ijms23074047.
32. Glancy B, Kane DA, Kavazis AN, Goodwin ML, Willis WT, Gladden LB. Mitochondrial lactate metabolism: history and implications for exercise and disease. *J Physiol.* 2021 Feb;599(3):863-888. doi: 10.1113/JP278930.
33. Chakrabarty RP, Chandel NS. Beyond ATP, new roles of mitochondria. *Biochem (Lond).* 2022 Aug;44(4):2-8. doi: 10.1042/bio_2022_119.
34. Shaw CS, Swinton C, Morales-Scholz MG, McRae N, Erftemeyer T, Aldous A, Murphy RM, Howlett KF. Impact of exercise training status on the fiber

- type-specific abundance of proteins regulating intramuscular lipid metabolism. *J Appl Physiol* (1985). 2020 Feb 1;128(2):379-389. doi: 10.1152/jappphysiol.00797.2019.
35. Aon MA, Bhatt N, Cortassa SC. Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess. *Front Physiol*. 2014 Jul 31;5:282. doi: 10.3389/fphys.2014.00282.
 36. Makrecka-Kuka M, Liepinsh E, Murray AJ, Lemieux H, Dambrova M, Tepp K, Puurand M, Käämbre T, Han WH, de Goede P, O'Brien KA, Turan B, Tuncay E, Olgar Y, Rolo AP, Palmeira CM, Boardman NT, Wüst RCI, Larsen TS. Altered mitochondrial metabolism in the insulin-resistant heart. *Acta Physiol (Oxf)*. 2020 Mar;228(3):e13430. doi: 10.1111/apha.13430.
 37. Nakamura M, Sadoshima J. Cardiomyopathy in obesity, insulin resistance and diabetes. *J Physiol*. 2020 Jul;598(14):2977-2993. doi: 10.1113/JP276747.
 38. Gaggini, M., Pingitore, A., & Vassalle, C. (2021). Plasma Ceramides Pathophysiology, Measurements, Challenges, and Opportunities. *Metabolites*, 11(11), 719. <https://doi.org/10.3390/metabo11110719>
 39. Tan Y, Zhang Z, Zheng C, Wintergerst KA, Keller BB, Cai L. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence. *Nat Rev Cardiol*. 2020 Sep;17(9):585-607. doi: 10.1038/s41569-020-0339-2.
 40. Gray S, Kim JK. New insights into insulin resistance in the diabetic heart. *Trends Endocrinol Metab*. 2011 Oct;22(10):394-403. doi: 10.1016/j.tem.2011.05.001.
 41. Aroor AR, Mandavia CH, Sowers JR. Insulin Resistance and Heart Failure: Molecular Mechanisms. *Heart failure clinics*. 2012 Oct 1; 8(4):609–617. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2012.06.005>
 42. Zhang Z, Huang Q, Zhao D, Lian F, Li X, Qi W. The impact of oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction on diabetic microvascular

- complications. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Feb 7;14:1112363. doi: 10.3389/fendo.2023.1112363.
43. Muzio G, Barrera G, Pizzimenti S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) and Oxidative Stress in Physiological Conditions and in Cancer. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Oct 29;10(11):1734. doi: 10.3390/antiox10111734.
44. Rius-Pérez S, Torres-Cuevas I, Monsalve M, Miranda FJ, Pérez S. Impairment of PGC-1 Alpha Up-Regulation Enhances Nitrosative Stress in the Liver during Acute Pancreatitis in Obese Mice. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Sep 19;9(9):887. doi: 10.3390/antiox9090887.
45. Piccinin E, Sardanelli AM, Seibel P, Moschetta A, Cocco T, Villani G. PGC-1s in the Spotlight with Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 28;22(7):3487. doi: 10.3390/ijms22073487.
46. Al Ojaimi M, Salah A, El-Hattab AW. Mitochondrial Fission and Fusion: Molecular Mechanisms, Biological Functions, and Related Disorders. *Membranes (Basel)*. 2022 Sep 16;12(9):893. doi: 10.3390/membranes12090893.
47. Leduc-Gaudet JP, Hussain SNA, Barreiro E, Gouspillou G. Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Skeletal Muscle Health and Aging. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 30;22(15):8179. doi: 10.3390/ijms22158179.
48. Quiles JM, Gustafsson ÅB. The role of mitochondrial fission in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol*. 2022 Nov;19(11):723-736. doi: 10.1038/s41569-022-00703-y.
49. Sui YB, Xiu J, Wei JX, Pan PP, Sun BH, Liu L. Shen Qi Li Xin formula improves chronic heart failure through balancing mitochondrial fission and fusion via upregulation of PGC-1 α . *J Physiol Sci*. 2021 Oct 18;71(1):32. doi: 10.1186/s12576-021-00816-y. Erratum in: *J Physiol Sci*. 2022 Oct 3;72(1):25. doi: 10.1186/s12576-022-00840-6.

50. Liu W, Li Y, Bo L, Li C, Jin F. Positive regulation of TFEB and mitophagy by PGC-1 α to alleviate LPS-induced acute lung injury in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Nov 5;577:1-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.08.064.
51. Holman RR, Bethel MA, Chan JC, Chiasson JL, Doran Z, Ge J, Gerstein H, Huo Y, McMurray JJ, Ryden L, Liyanage W, Schröder S, Tendera M, Theodorakis MJ, Tuomilehto J, Yang W, Hu D, Pan C; ACE Study Group. Rationale for and design of the Acarbose Cardiovascular Evaluation (ACE) trial. *Am Heart J*. 2014 Jul;168(1):23-9.e2. doi: 10.1016/j.ahj.2014.03.021.
52. Dhara A, Aier I, Paladhi A, Varadwaj PK, Hira SK, Sen N. PGC1 alpha coactivates ERG fusion to drive antioxidant target genes under metabolic stress. *Commun Biol*. 2022 May 4;5(1):416. doi: 10.1038/s42003-022-03385-x.
53. Sjögren RJO, Rizo-Roca D, Chibalin AV, Chorell E, Furrer R, Katayama S, Harada J, Karlsson HKR, Handschin C, Moritz T, Krook A, Näslund E, Zierath JR. Branched-chain amino acid metabolism is regulated by ERR α in primary human myotubes and is further impaired by glucose loading in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2021 Sep;64(9):2077-2091. doi: 10.1007/s00125-021-05481-9.
54. Ren J, Wu NN, Wang S, Sowers JR, Zhang Y. Obesity cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Physiol Rev*. 2021 Oct 1;101(4):1745-1807. doi: 10.1152/physrev.00030.2020.
55. Hu T, Wu Q, Yao Q, Yu J, Jiang K, Wan Y, Tang Q. PRDM16 exerts critical role in myocardial metabolism and energetics in type 2 diabetes induced cardiomyopathy. *Metabolism*. 2023 Sep;146:155658. doi: 10.1016/j.metabol.2023.155658.
56. Wang SY, Zhu S, Wu J, Zhang M, Xu Y, Xu W, Cui J, Yu B, Cao W, Liu J. Exercise enhances cardiac function by improving mitochondrial dysfunction and maintaining energy homeostasis in the development of diabetic cardiomyopathy. *J Mol Med (Berl)*. 2020 Feb;98(2):245-261. doi: 10.1007/s00109-019-01861-2.

57. Actis Dato V, Lange S, Cho Y. Metabolic Flexibility of the Heart: The Role of Fatty Acid Metabolism in Health, Heart Failure, and Cardiometabolic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2024 Jan 19;25(2):1211. doi: 10.3390/ijms25021211.
58. Murtaza G, Virk HUH, Khalid M, Lavie CJ, Ventura H, Mukherjee D, Ramu V, Bhogal S, Kumar G, Shanmugasundaram M, Paul TK. Diabetic cardiomyopathy - A comprehensive updated review. *Prog Cardiovasc Dis.* 2019 Jul-Aug;62(4):315-326. doi: 10.1016/j.pcad.2019.03.003.
59. Bolli R, Li QH, Tang XL, Guo Y, Xuan YT, Rokosh G, Dawn B. Пізня фаза преко́ндиціонування та її природне клінічне застосування - генна терапія. *Heart Fail Rev.* 2007 Dec;12(3-4):189-99. doi: 10.1007/s10741-007-9031-4.
60. Penna, C., Andreadou, I., Aragno, M., Beauloye, C., Bertrand, L., Lazou, A., Falcão-Pires, I., Bell, R., Zuurbier, C. J., Pagliaro, P., & Hausenloy, D. J. (2020). Effect of hyperglycaemia and diabetes on acute myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischaemic conditioning protocols. *British journal of pharmacology*, 177(23), 5312–5335. <https://doi.org/10.1111/bph.14993>
61. Portnychenko, A. H., Vasylenko, M. I., & Moïbenko, O. O. (2003). Vplyv hostroï hipoksychnoï hipoksiï na induktsiiu syntazy oksydu azotu u shchuriv [Effect of acute hypoxic hypoxia on nitric oxide synthase induction in rats]. *Fiziolohichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine : 1994)*, 49(3), 47–49.
62. Portnychenko, A. H., Rozova, K. V., Vasylenko, M. I., & Moïbenko, O. O. (2007). *Fiziolohichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine : 1994)*, 53(4), 27–34.
63. Xi L, Tekin D, Erdal Gursoy, Salloum FN, Levasseur JE, Kukreja RC. Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia. 2002 Jul 1;283(1):H5–12. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00920.2001>
64. Portnichenko AG PA, Lapikova-Briginskaia TIu LBTi, Vasilenko MI VM, Portnichenko GV PG, Maslov LN ML, Moïbenko AA MA. The expression of Akt kinase in the heart ventricles under hypoxic preconditioning and

- myocardial remodeling. *Fiziologichnyĭ zhurnal*. 2014 Jan 15;59(6):124–31. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz59.06.124>.
65. Jašová M, Kancirová I, Waczulíková I, Ferko M. Mitochondria as a target of cardioprotection in models of preconditioning. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2017 Jul 20;49(5):357–68. <https://doi.org/10.1007/s10863-017-9720-1>.
 66. Ferko M, Andelová N, Szeiffová Bačová B, Jašová M. Myocardial Adaptation in Pseudohypoxia: Signaling and Regulation of mPTP via Mitochondrial Connexin 43 and Cardiolipin. *Cells*. 2019 Nov 17;8(11):1449. doi: 10.3390/cells8111449.
 67. Gutsaeva DR, Carraway MS, Suliman HB, Demchenko IT, Shitara H, Yonekawa H, Piantadosi CA. Transient hypoxia stimulates mitochondrial biogenesis in brain subcortex by a neuronal nitric oxide synthase-dependent mechanism. *J Neurosci*. 2008 Feb 27;28(9):2015-24. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5654-07.2008.
 68. Moro C, Magnan C. Revisited guidelines for metabolic tolerance tests in mice. *Lab Animal*. 2024 Nov 25; <https://doi.org/10.1038/s41684-024-01473-5>.
 69. Furuya DT, Binsack R, Machado UF. Low ethanol consumption increases insulin sensitivity in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Jan;36(1):125-30. doi: 10.1590/s0100-879x2003000100017.
 70. Gastaldelli A. Measuring and estimating insulin resistance in clinical and research settings. *Obesity (Silver Spring)*. 2022 Aug;30(8):1549-1563. doi: 10.1002/oby.23503.
 71. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Lernmark Å, Metzger BE, Nathan DM, Kirkman MS. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2023 Oct 1;46(10):e151-e199. doi: 10.2337/dci23-0036.
 72. Jacob DJ. Introduction to atmospheric chemistry. Princeton, New Jersey: Princeton University Press; 1999.

73. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflüger, Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Thiere*. 1895 Aug;61(6):291–332. <https://doi.org/10.1007/bf01812150>.
74. Heusch G. Myocardial ischemia: lack of coronary blood flow, myocardial oxygen supply-demand imbalance, or what? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019 Jun 1;316(6):H1439-H1446. doi: 10.1152/ajpheart.00139.2019.
75. Herr DJ, Aune SE, Menick DR. Induction and Assessment of Ischemia-reperfusion Injury in Langendorff-perfused Rat Hearts. *J Vis Exp*. 2015 Jul 27;(101):e52908. doi: 10.3791/52908.
76. Motayagheni N. Modified Langendorff technique for mouse heart cannulation: Improved heart quality and decreased risk of ischemia. *MethodsX*. 2017;4:508–12. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2017.11.004>.
77. Schechter MA, Southerland KW, Feger BJ, Linder D Jr, Ali AA, Njoroge L, Milano CA, Bowles DE. An isolated working heart system for large animal models. *J Vis Exp*. 2014 Jun 11;(88):51671. doi: 10.3791/51671.
78. CHANCE B, WILLIAMS GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem*. 1955 Nov;217(1):383-93.
79. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
80. Lopez J. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood and David E. Bruns (eds): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis* (5th edition). *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2012 Dec 13;28(1):104–5. <https://doi.org/10.1007/s12291-012-0287-7>.
81. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*. 1978 May;86(1):271–8. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1).

82. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*. 1968;25(1):192–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4).
83. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972 May 25;247(10):3170-5.
84. Hadwan MH. Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues. *BMC Biochem*. 2018 Aug 3;19(1):7. doi: 10.1186/s12858-018-0097-5.
85. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
86. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
87. Fuchs M, Ehlers K, Will T, van Bel AJ. Immunolocalization indicates plasmodesmal trafficking of storage proteins during cambial reactivation in *Populus nigra*. *Ann Bot*. 2010 Sep;106(3):385-94. doi: 10.1093/aob/mcq130.
88. Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol*. 1969;26:235-302. doi: 10.1016/s0074-7696(08)61637-x.
89. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*. 2020 Jan;43(Suppl 1):S14-S31. doi: 10.2337/dc20-S002.
90. Козловська М.Г., Василенко М.І., Гончар О.О., Розова К.В, Портниченко А.Г. Активація мітохондріальних механізмів кардіопротекції при ішемії-реперфузії ізольованого серця щурів з інсулінорезистентністю. *Фізіологічний журнал*. 2025, 71(1): 71-78. doi: 10.15407/fz71.01.071.

91. Zavorodnii M.O., Nosar V.I., Tsapenko P.K., Kozlovska M.G., Gonchar O.O., Vasylenko M.I., Portnichenko V.I., Portnychenko A.G. Blockade of L-type calcium channels alters hepatic mitochondrial function in insulin-resistant rats. *Fiziologichnyi Zhurnal*. 2023, 69(6): 88-96. doi: 10.15407/fz69.06.088.
92. Алієв Р.Б., Розова К.В., Козловська М.Г., Василенко М.І., Дубова М.Г., Шаповалова А.С., Портниченко А.Г. Морфологічні передумови метаболічних порушень при коморбідному перебігу запального процесу в легенях та цукрового діабету 2 типу у щурів. Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. 2023, 4: 54-64. doi: 10.30978/TB2023-4-54.
93. Portnychenko A.G., Vasylenko M.I., Aliiev R.B., Kozlovska M.G., Zavorodnii M.O., Tsapenko P.K., Rozova K.V., Portnichenko V.I. The prerequisites for the development of type 2 diabetes or prediabetes in rats fed a high-fat diet. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 2023, 14(1):8–14. doi: 10.15421/022303.
94. Цапенко П.К., Василенко М.І., Алієв Р.Б., Завгородній М.О., Козловська М.Г., Топчанюк Л.Я., Сидоренко А.М., Братусь Л.В., Бакуновський О.М., Портніченко В.І., Портниченко А.Г. Вплив високожирової дієти на розвиток інсулінорезистентності та метаболічного синдрому у щурів. *Укр. журн. мед. біол. спорт.* 2020, 5(3): 441–444. doi: 10.26693/jmbs05.03.441.
95. Kozlovska M.G., Zavorodnii M.O., Vasylenko M.I., Rozova K.V., Dubova M.G., Portnychenko A.G. Hypoxic Preconditioning Exerts Cardioprotective Effect in Ischemic Injury Against Insulin Resistance and Myocardial Hypertrophy in Rats. 10th Annual Summit on Cardiovascular, Renal and Glycemic Outcomes - The Virtual CVOT Summit 2024, Munich, Germany, 05-06 Dec 2024. *Diabetes, Metabolism, and the Heart* 2024; 33:22.
96. Kozlovska M.G., Zavorodnyi M.O., Vasylenko M.I., Portnychenko A.G. Hypoxic preconditioning alters the level of PGC-1 expression in myocardium of rats with insulin resistance and myocardial hypertrophy. Тези доповідей

- Міжнародної конференції з нейронаук та Наукових читань, присвячених вісцеральній фізіології та патофізіології. 19-21 листопада 2024 р. Фізіологічний журнал. 2024, 5(70), дод.: 47-48. doi: 10.15407/fz70.05S.001.
97. Kozlovska M.G., Zavorodniy M.O., Vasylenko M.I., Rozova K.V., Dubova M.G., Nosar V.I., Portnychenko A.G. Hypoxic preconditioning improves the condition of myocardial mitochondria in rats with insulin resistance. Матеріали ІХ Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю: «Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України». Івано-Франківськ, 19-21 вересня 2024 р. - Івано-Франківськ: ІФНМУ, 2024. С. 20-21.
98. Козловська М.Г., Василенко М.І., Портниченко А.Г. Гіпоксичне прекодиціювання зменшує розмір інфаркту міокарда у щурів при високожировій дієті. Науково-практична конференція «Інноваційні підходи в лікуванні та профілактиці ендокринних захворювань». Харків, 4 липня 2024.– Харків: ДУ ІПЕП, 2024. С.53-54.
99. Kozlovska M.G., Zavorodniy M.O., Vasylenko M.I., Rozova K.V., Dubova M.G., Portnychenko A.G. Hypoxic preconditioning makes a cardioprotective effect on the ultrastructure of the myocardium in ischemic injury and insulin resistance in rats. XXIII–і читання В. В. Підвисоцького: Бюлетень матеріалів наукової конференції (16-17 травня 2024 року). Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2024. С.12-13.
100. Козловська М.Г., Завгородній М.О., Василенко М.І., Розова К.В., Дубова М.Г., Носар В.І., Портниченко А.Г. Гіпоксичне прекодиціювання покращує стан мітохондрій при інсулінорезистентності. Матеріали VI науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації». Харків, 16 травня 2024 р. С. 117-118.

101. Kozlovska M.G., Gonchar O.O., Vasylenko M.I., Tsapenko P.K., Portnychenko A.G. Antioxidant Properties of PGC-1 in Hypoxic Preconditioning and Insulin Resistance. 9th Annual Summit on Cardiovascular, Renal and Glycemic Outcomes - The Virtual CVOT Summit 2023, Munich, Germany, 30 Nov – 01 Dec 2023. *Diabetes, Metabolism, and the Heart* 2023; 32:27-28.
102. Козловська М.Г., Завгородній М.О., Носар В.І., Цапенко П.К., Василенко М.І., Портниченко А.Г. Гіпоксичне прекондиціонування змінює функцію мітохондрій кардіоміоцитів у щурів з інсулінорезистентністю та гіпертрофією міокарда. VI науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція». Харків, 16 листопада 2023 р. С. 247-248.
103. Kozlovska M., Nosar V., Zavorodnii M., Vasylenko M., Rozova K., Portnychenko A. Hypoxic preconditioning changes the function of myocardial mitochondria in rats with insulin resistance and arterial hypertension. 8th Annual Summit on Cardiovascular, Renal and Glycemic Outcomes - The Virtual CVOT Summit 2022, Munich, Germany, 10-11 Nov 2022. P 31. *Diabetes, Metabolism, and the Heart* 2022; 31:27.
104. Козловська М.Г., Василенко М.І., Портниченко А.Г. Вплив гіпоксичного прекондиціонування на зміни експресії PGC-1 у міокарді щурів при інсулінорезистентності та артеріальній гіпертензії. Матеріали XIII науково-практичної конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм», Тернопіль, 26-28 жовтня 2022 р. С.34-35.
105. Babicheva V., Kozlovska M., Vasylenko M., Portnychenko A. Hypoxic preconditioning effects change in hypertrophied or insulin resistant rat hearts. 6th Congress of the ESC Council on Basic Cardiovascular Science «Frontiers in CardioVascular Biomedicine 2022» (Budapest, Hungary, 29th April – 1st

- May). Cardiovascular Research, Volume 118, Issue Supplement_1, June 2022, cvac066.045, doi: 10.1093/cvr/cvac066.045.
106. Козловська М.Г., Василенко М.І., Гончар О.О., Портниченко А.Г. Особливості антиоксидантного захисту міокарда щурів із інсулінорезистентністю при гіпоксичному прекондиціюванні. Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України: тези доповідей VIII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю (6-8 жовтня 2021 р.). – Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2021. Т.2. С. 115-116.
 107. Козловська М.Г., Бабічева В.В., Василенко М.І., Портниченко А.Г. Вплив гіпоксичного прекондиціювання на розмір інфаркту міокарда при інсулінорезистентності та артеріальній гіпертензії. III науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації». Харків, 12 травня 2021 р. С. 92.
 108. Бабічева В.В., Козловська М.Г., Василенко М.І., Портниченко А.Г. Антиапоптотичний ефект гіпоксичного прекондиціювання при моделюванні важкої гіпоксії та при інсулінорезистентності. Перші читання, присвячені Д.О. Альперну «Актуальні питання патологічної фізіології»: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції (до 150-річчя кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна). Харків: ХНМУ, 26 березня 2021. С. 35-36.
 109. Козловська М.Г., Бабічева В.В., Василенко М.І., Портниченко А.Г. Особливості кардіопротекторних ефектів гіпоксичного прекондиціювання при інсулінорезистентності. II Галицькі читання і XII Науково-практична конференція «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм», присвячена 100-річчю проф. Бергера Е.Н. і 90-річчю проф. Маркової О.О. Тернопіль, 29-30 жовтня 2020 р. С.56.

110. Бабічева В.В., Пономарьова І.В., Козловська М.Г., Василенко М.І., Портниченко А.Г. Гіпоксичне прекодиціювання при патології міокарда та його механізми. Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України: тези доповідей VIII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю (13-15 травня 2020 р.). Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2020. Т.1. С. 32-33.
111. Park SY, Cho YR, Kim HJ, Higashimori T, Danton C, Lee MK, Dey A, Rothermel B, Kim YB, Kalinowski A, Russell KS, Kim JK. Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice. *Diabetes*. 2005 Dec;54(12):3530-40. doi: 10.2337/diabetes.54.12.3530.
112. Castro-Barquero S, Ruiz-León AM, Sierra-Pérez M, Estruch R, Casas R. Dietary Strategies for Metabolic Syndrome: A Comprehensive Review. *Nutrients*. 2020 Sep 29;12(10):2983. doi: 10.3390/nu12102983.
113. Wright JJ, Kim J, Buchanan J, Boudina S, Sena S, Bakirtzi K, Ilkun O, Theobald HA, Cooksey RC, Kandrор KV, Abel ED. Mechanisms for increased myocardial fatty acid utilization following short-term high-fat feeding. *Cardiovasc Res*. 2009 May 1;82(2):351-60. doi: 10.1093/cvr/cvp017.
114. Riehle C, Abel ED. Insulin Signaling and Heart Failure. *Circ Res*. 2016 Apr 1;118(7):1151-69. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306206.
115. Battiprolu PK, Hojayeв B, Jiang N, Wang ZV, Luo X, Iglewski M, Shelton JM, Gerard RD, Rothermel BA, Gillette TG, Lavandero S, Hill JA. Metabolic stress-induced activation of FoxO1 triggers diabetic cardiomyopathy in mice. *J Clin Invest*. 2012 Mar;122(3):1109-18. doi: 10.1172/JCI60329.
116. Westermeier F, Navarro-Marquez M, López-Crisosto C, Bravo-Sagua R, Quiroga C, Bustamante M, et al. Defective insulin signaling and mitochondrial dynamics in diabetic cardiomyopathy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2015 May;1853(5):1113–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.005>.

117. Wali JA, Jarzebska N, Raubenheimer D, Simpson SJ, Rodionov RN, O'Sullivan JF. Cardio-Metabolic Effects of High-Fat Diets and Their Underlying Mechanisms-A Narrative Review. *Nutrients*. 2020 May 21;12(5):1505. doi: 10.3390/nu12051505.
118. Pettersson US, Waldén TB, Carlsson PO, Jansson L, Phillipson M. Female mice are protected against high-fat diet induced metabolic syndrome and increase the regulatory T cell population in adipose tissue. *PLoS One*. 2012;7(9):e46057. doi: 10.1371/journal.pone.0046057.
119. Yang A, Mottillo EP. Adipocyte lipolysis: from molecular mechanisms of regulation to disease and therapeutics. *Biochem J*. 2020 Mar 13;477(5):985-1008. doi: 10.1042/BCJ20190468.
120. Rindler PM, Crewe CL, Fernandes J, Kinter M, Szweda LI. Redox regulation of insulin sensitivity due to enhanced fatty acid utilization in the mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013 Sep 1;305(5):H634-43. doi: 10.1152/ajpheart.00799.2012.
121. Ansley DM, Wang B. Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart. *J Pathol*. 2013 Jan;229(2):232-41. doi: 10.1002/path.4113.
122. Sultana MR, Bagul PK, Katare PB, Anwar Mohammed S, Padiya R, Banerjee SK. Garlic activates SIRT-3 to prevent cardiac oxidative stress and mitochondrial dysfunction in diabetes. *Life Sci*. 2016 Nov 1;164:42-51. doi: 10.1016/j.lfs.2016.08.030.
123. Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis*. 2015 Mar 10;6(2):109-20. doi: 10.14336/AD.2014.0305.
124. Zhuang B, Zhong C, Ma Y, Wang A, Quan H, Hong L. Innovative Therapeutic Strategies for Myocardial Infarction Across Various Stages: Non-Coding RNA and Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2024 Dec 30;26(1):231. doi: 10.3390/ijms26010231.

125. Galloway CA, Yoon Y. Mitochondrial dynamics in diabetic cardiomyopathy. *Antioxid Redox Signal.* 2015 Jun 10;22(17):1545-62. doi: 10.1089/ars.2015.6293.
126. Kassab S, Albalawi Z, Daghistani H, Kitmitto A. Mitochondrial Arrest on the Microtubule Highway-A Feature of Heart Failure and Diabetic Cardiomyopathy? *Front Cardiovasc Med.* 2021 Jul 2;8:689101. doi: 10.3389/fcvm.2021.689101.
127. Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, Smith SR. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes.* 2005 Jul;54(7):1926-33. doi: 10.2337/diabetes.54.7.1926.
128. Adepu KK, Anishkin A, Adams SH, Chintapalli SV. A versatile delivery vehicle for cellular oxygen and fuels or metabolic sensor? A review and perspective on the functions of myoglobin. *Physiol Rev.* 2024 Oct 1;104(4):1611-1642. doi: 10.1152/physrev.00031.2023.
129. Penna C, Granata R, Tocchetti CG, Gallo MP, Alloatti G, Pagliaro P. Endogenous Cardioprotective Agents: Role in Pre and Postconditioning. *Curr Drug Targets.* 2015;16(8):843-67. doi: 10.2174/1389450116666150309115536.
130. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Feb;19(2):121-135. doi: 10.1038/nrm.2017.95.
131. Theeuwes WF, Gosker HR, Langen RCJ, Pansters NAM, Schols AMWJ, Remels AHV. Inactivation of glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) enhances mitochondrial biogenesis during myogenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018 Sep;1864 (9 Pt B):2913-2926. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.06.002.
132. Toksoy Z, Ma Y, Goedeke L, Li W, Hu X, Wu X, Cacheux M, Liu Y, Akar FG, Shulman GI, Young LH. Role of AMPK in Atrial Metabolic Homeostasis

- and Substrate Preference. *bioRxiv* [Preprint]. 2024 Aug 30:2024.08.29.608789. doi: 10.1101/2024.08.29.608789.
133. Zhang H, Komatsu T, Nakashima S, Abe S, Kawachi E, Imaizumi S, Saku K, Uehara Y. HDL Mimetics Enhances Mitochondrial Function via Stimulation of PGC1- α . *Eur Cardiol*. 2023 Apr 25;18:e27. doi: 10.15420/ecr.2023.18.PO10.
134. Anderson RM, Barger JL, Edwards MG, Braun KH, O'Connor CE, Prolla TA, Weindruch R. Dynamic regulation of PGC-1 α localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. *Aging Cell*. 2008 Jan;7(1):101-11. doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00357.x.
135. Larson-Casey JL, Gu L, Davis D, Cai GQ, Ding Q, He C, Carter AB. Post-translational regulation of PGC-1 α modulates fibrotic repair. *FASEB J*. 2021 Jun;35(6):e21675. doi: 10.1096/fj.202100339R.
136. Baldelli S, Lettieri Barbato D, Tatulli G, Aquilano K, Ciriolo MR. The role of nNOS and PGC-1 α in skeletal muscle cells. *J Cell Sci*. 2014 Nov 15;127(Pt 22):4813-20. doi: 10.1242/jcs.154229.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача:

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Козловська М.Г.**, Василенко М.І., Гончар О.О., Розова К.В., Портниченко А.Г. Активація мітохондріальних механізмів кардіопротекції при ішемії-реперфузії ізольованого серця щурів з інсулінорезистентністю. Фізіологічний журнал. 2025, 71(1): 71-78. doi: 10.15407/fz71.01.071. (Scopus)

Здобувачкою сформульовано ідею дослідження, здійснено інформаційний пошук, проведено експериментальні дослідження, збір експериментальних даних, їх аналіз, написано статтю.

2. Zavorodnii M.O., Nosar V.I., Tsapenko P.K., **Kozlovska M.G.**, Gonchar O.O., Vasylenko M.I., Portnichenko V.I., Portnychenko A.G. Blockade of L-type calcium channels alters hepatic mitochondrial function in insulin-resistant rats. Fiziologichnyi Zhurnal. 2023, 69(6): 88-96. doi: 10.15407/fz69.06.088. (Scopus)

Здобувачкою прийнято участь у проведенні експериментальних досліджень, зборі експериментальних даних, їх аналізі, написанні статті.

3. Алієв Р.Б., Розова К.В., **Козловська М.Г.**, Василенко М.І., Дубова М.Г., Шаповалова А.С., Портниченко А.Г. Морфологічні передумови метаболічних порушень при коморбідному перебігу запального процесу в легенях

та цукрового діабету 2 типу у щурів. Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. 2023, 4: 54-64. doi: 10.30978/TB2023-4-54. (Scopus)

Здобувачкою безпосередньо проведено експериментальні дослідження, прийнято участь у зборі експериментальних даних, їх аналізі, написанні статті.

4. Portnychenko A.G., Vasylenko M.I., Aliiev R.B., **Kozlovska M.G.**, Zavorodnii M.O., Tsapenko P.K., Rozova K.V., Portnichenko V.I. The prerequisites for the development of type 2 diabetes or prediabetes in rats fed a high-fat diet. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 2023, 14(1):8–14. doi: 10.15421/022303. (Scopus , Web of Science)

Здобувачкою безпосередньо проведено експериментальні дослідження, прийнято участь у плануванні дослідження, зборі інформаційних та експериментальних даних, їх аналізі, написанні статті.

5. Цапенко П.К., Василенко М.І., Алієв Р.Б., Завгородній М.О., **Козловська М.Г.**, Гопчанюк Л.Я., Сидоренко А.М., Братусь Л.В., Бакуновський О.М., Портніченко В.І., Портніченко А.Г. Вплив високожирової дієти на розвиток інсулінорезистентності та метаболічного синдрому у щурів. Укр. журн. мед. біол. спорт. 2020, 5(3): 441–444. doi: 10.26693/jmbs05.03.441.

Здобувачкою прийнято участь у проведенні експериментальних досліджень, зборі експериментальних даних, їх аналізі, написанні статті.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Kozlovska M.G.**, Zavorodniy M.O., Vasylenko M.I., Rozova K.V., Dubova M.G., Portnychenko A.G. Hypoxic Preconditioning Exerts Cardioprotective

Effect in Ischemic Injury Against Insulin Resistance and Myocardial Hypertrophy in Rats. 10th Annual Summit on Cardiovascular, Renal and Glycemic Outcomes - The Virtual CVOT Summit 2024, Munich, Germany, 05-06 Dec 2024. *Diabetes, Metabolism, and the Heart* 2024; 33:22.

2. **Kozlovska M.G.**, Zavgorodnyi M.O., Vasylenko M.I., Portnychenko A.G. Hypoxic preconditioning alters the level of PGC-1 expression in myocardium of rats with insulin resistance and myocardial hypertrophy. Тези доповідей Міжнародної конференції з нейронаук та Наукових читань, присвячених вісцеральній фізіології та патофізіології. 19-21 листопада 2024 р. *Фізіологічний журнал*. 2024, 5(70), дод.: 47-48. doi: 10.15407/fz70.05S.001 . (Scopus)

3. **Kozlovska M.G.**, Zavhorodniy M.O., Vasylenko M.I., Rozova K.V., Dubova M.G., Nosar V.I., Portnychenko A.G. Hypoxic preconditioning improves the condition of myocardial mitochondria in rats with insulin resistance. Матеріали ІХ Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю: «Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України». Івано-Франківськ, 19-21 вересня 2024 р. - Івано-Франківськ: ІФНМУ, 2024. С. 20-21.

4. **Козловська М.Г.**, Василенко М.І., Портниченко А.Г. Гіпоксичне прекодиціонування зменшує розмір інфаркту міокарда у щурів при високожировій дієті. Науково-практична конференція «Інноваційні підходи в лікуванні та профілактиці ендокринних захворювань». Харків, 4 липня 2024.– Харків: ДУ ІПЕП, 2024. С.53-54.

5. **Kozlovska M.G.**, Zavhorodniy M.O., Vasylenko M.I., Rozova K.V., Dubova M.G., Portnychenko A.G. Hypoxic preconditioning makes a cardioprotective effect on the ultrastructure of the myocardium in ischemic injury and insulin resistance in rats. XXIII–і читання В. В. Підвисоцького: Бюлетень матеріалів наукової конференції (16-17 травня 2024 року). Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2024. С.12-13.

6. **Козловська М.Г.**, Завгородній М.О., Василенко М.І., Розова К.В., Дубова М.Г., Носар В.І., Портниченко А.Г. Гіпоксичне прекодиціонування покращує стан мітохондрій при інсулінорезистентності. Матеріали VI науково-

практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації». Харків, 16 травня 2024 р. С. 117-118.

7. **Kozlovska M.G.**, Gonchar O.O., Vasylenko M.I., Tsapenko P.K., Portnychenko A.G. Antioxidant Properties of PGC-1 in Hypoxic Preconditioning and Insulin Resistance. 9th Annual Summit on Cardiovascular, Renal and Glycemic Outcomes - The Virtual CVOT Summit 2023, Munich, Germany, 30 Nov – 01 Dec 2023. *Diabetes, Metabolism, and the Heart* 2023; 32:27-28.

8. **Козловська М.Г.**, Завгородній М.О., Носар В.І., Цапенко П.К., Василенко М.І., Портниченко А.Г. Гіпоксичне прекондиціонування змінює функцію мітохондрій кардіоміоцитів у щурів з інсулінорезистентністю та гіпертрофією міокарда. VI науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція». Харків, 16 листопада 2023 р. С. 247-248.

9. **Kozlovska M.**, Nosar V., Zavorodnii M., Vasylenko M., Rozova K., Portnychenko A. Hypoxic preconditioning changes the function of myocardial mitochondria in rats with insulin resistance and arterial hypertension. 8th Annual Summit on Cardiovascular, Renal and Glycemic Outcomes - The Virtual CVOT Summit 2022, Munich, Germany, 10-11 Nov 2022. P 31. *Diabetes, Metabolism, and the Heart* 2022; 31:27.

10. **Козловська М.Г.**, Василенко М.І., Портниченко А.Г. Вплив гіпоксичного прекондиціонування на зміни експресії PGC-1 у міокарді щурів при інсулінорезистентності та артеріальній гіпертензії. Матеріали XIII науково-практичної конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм», Тернопіль, 26-28 жовтня 2022 р. С.34-35.

11. Babicheva V., **Kozlovska M.**, Vasylenko M., Portnychenko A. Hypoxic preconditioning effects change in hypertrophied or insulin resistant rat hearts. 6th Congress of the ESC Council on Basic Cardiovascular Science «Frontiers in CardioVascular Biomedicine 2022» (Budapest, Hungary, 29th April – 1st May).

Cardiovascular Research, Volume 118, Issue Supplement_1, June 2022, cvac066.045, doi: 10.1093/cvr/cvac066.045. (Scopus)

12. **Козловська М.Г.**, Василенко М.І., Гончар О.О., Портниченко А.Г. Особливості антиоксидантного захисту міокарда щурів із інсулінорезистентністю при гіпоксичному прекондиціюванні. Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України: тези доповідей VIII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю (6-8 жовтня 2021 р.). – Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2021. Т.2. С. 115-116.

13. **Козловська М.Г.**, Бабічева В.В., Василенко М.І., Портниченко А.Г. Вплив гіпоксичного прекондиціювання на розмір інфаркту міокарда при інсулінорезистентності та артеріальній гіпертензії. III науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації». Харків, 12 травня 2021 р. С. 92.

14. Бабічева В.В., **Козловська М.Г.**, Василенко М.І., Портниченко А.Г. Антиапоптотичний ефект гіпоксичного прекондиціювання при моделюванні важкої гіпоксії та при інсулінорезистентності. Перші читання, присвячені Д.О. Альперну «Актуальні питання патологічної фізіології»: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції (до 150-річчя кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна). Харків: ХНМУ, 26 березня 2021. С. 35-36.

15. **Козловська М.Г.**, Бабічева В.В., Василенко М.І., Портниченко А.Г. Особливості кардіопротекторних ефектів гіпоксичного прекондиціювання при інсулінорезистентності. II Галицькі читання і XII Науково-практична конференція «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм», присвячена 100-річчю проф. Бергера Е.Н. і 90-річчю проф. Маркової О.О. Тернопіль, 29-30 жовтня 2020 р. С.56.

16. Бабічева В.В., Пономарьова І.В., **Козловська М.Г.**, Василенко М.І., Портниченко А.Г. Гіпоксичне прекондиціювання при патології міокарда та його механізми. Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України: тези доповідей VIII

Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю (13-15 травня 2020 р.). Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2020. Т.1. С. 32-33.

Апробація результатів дисертації

Основні положення та результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на таких заходах:

- 8th, 9th, 10th Annual Summit on Cardiovascular, Renal and Glycemic Outcomes - The Virtual CVOT Summit 2024, (Munich, Germany, 10-11 Nov 2022; 30 Nov – 01 Dec 2023; 05-06 Dec 2024);
- Міжнародна конференція з нейронаук та Наукові читання, присвячені вісцеральній фізіології та патофізіології (Київ, 19-21 листопада 2024 р.);
- VIII, IX Національний конгрес патофізіологів України з міжнародною участю: «Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України» (Одеса, 13-15 травня 2020 р; 6-8 жовтня 2021 р; Івано-Франківськ, 19-21 вересня 2024 р.);
- Науково-практична конференція «Інноваційні підходи в лікуванні та профілактиці ендокринних захворювань» (Харків, 4 липня 2024 р.);
- XXII, XXIII Читання ім. В.В. Підвисоцького (Одеса, 18-19 травня 2023 р.; 16 – 17 травня 2024 р.);
- III, VI науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (Харків, 12 травня 2021 р.; 16 травня 2024 р.);
- VI науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (Харків, 16 листопада 2023 р.);
- Науковий семінар Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (Київ, 6 листопада 2023 р.);

- XIII науково-практична конференція «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 26-28 жовтня 2022 р.);
- 6th Congress of the ESC Council on Basic Cardiovascular Science «Frontiers in CardioVascular Biomedicine 2022» (Budapest, Hungary, 29th April – 1st May);
- World Congress on Acute Heart Failure «Heart Failure 2021 Online Congress» (29 June - 1 July 2021, Online Congress);
- Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання патологічної фізіології» (Харків, 26 березня 2021 р.);
- II Галицькі читання і XII Науково-практична конференція «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 29-30 жовтня 2020 р.).