

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ НАН УКРАЇНИ

ЛАПІКОВА-БРИГІНСЬКА ТЕТЯНА ЮРІЇВНА

УДК 612.176: (612.14+577.25+616.127+57.05)

**РОЛЬ ІНСУЛІНОПОДІБНОГО ФАКТОРУ РОСТУ 1 (IGF-1)
У МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МЕХАНІЗМАХ РОЗВИТКУ
ГІПЕРТРОФІЇ МІОКАРДА**

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі загальної та молекулярної патофізіології
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Науковий керівник

Доктор медичних наук *Портниченко Алла Георгіївна*
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України
завідувач відділу з вивчення гіпоксичних станів

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор

Дроздовська Світлана Богданівна,

завідувач лабораторії стимуляції працездатності та адаптаційних реакцій у
спорті вищих досягнень Науково-дослідного інституту Національного
університету фізичного виховання і спорту України

доктор біологічних наук

Лабунець Ірина Федорівна,

завідувач лабораторії експериментального моделювання відділу клітинних
та тканинних технологій «Інститут генетичної та регенеративної медицини
НАМН України»

Захист відбудеться «19» січня 2021 року о 14.00 годині на засіданні
спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О.
Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

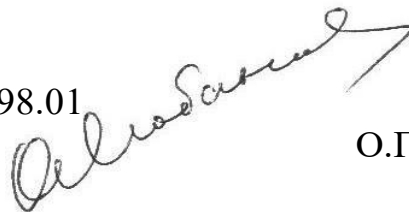
З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту фізіології ім.
О.О. Богомольця НАН України та на сайті інституту:
http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council

Автореферат розісланий «14» грудня 2020 року

Вчений секретар

Спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01

Кандидат біологічних наук



О.П.Любанова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Серцево-судинні захворювання (ССЗ) переважають в структурі смертності всіх країн світу, незалежно від рівня економічного розвитку, ці показники складають 42% серед чоловіків і 52% серед жінок [M. Nichols 2013, B. Ziaeiian 2016]. Гіпертрофія міокарда (ГМ) є визнаним фактором ризику серцево-судинних захворювань, розвитку ремоделювання серця, серцевої недостатності та смертності, але причини та молекулярні механізми розвитку цього стану є недостатньо вивченими [I. Shiojima 2005, W. Nadruz 2015]. Хоча гіпертрофія у дорослому віці, у кінцевому підсумку, може призвести до захворювань серцево-судинної системи, проте не обов'язково є дезадаптивною [B. Bernardo 2010, J. R. McMullen 2007]. Наразі є прогрес у розумінні структурних та молекулярних характеристик ГМ, викликаній різними чинниками, зокрема ендокринними ефекторами і пов'язаних з ними сигнальними шляхами. Вважають, що адаптивна гіпертрофія ініціюється сигналами, до яких відносяться гормони і фактори росту (такі як: гормон росту, тироксин, інсулін, інсуліноподібний фактор росту 1, фактор росту судинного ендотелію та ін.) та постнавантаження, що сходяться на внутрішньоклітинних сигнальних шляхах (серед них PI3K, Akt, AMP-активована протеїнкіназа та mTOR), що впливають на транскрипцію генів, трансляцію білка та метаболізм, сприяють виживанню, проліферації та клітинному росту [R. Foncea 1997, Y. Fujio 2000, T. Matsui 2003, L. Elia 2009]. Можливо, що до цього процесу також можуть бути залучені некодуючі РНК, зокрема, основна міокардіальна мікроРНК-1, яка може регулювати транскрипцію гена IGF-1 [D. Sayed 2007, S. Greco 2017, T. Sun 2017]. Незважаючи на те, що залучення багатьох сигнальних шляхів до розвитку гіпертрофії відоме, динаміка активації тих чи інших молекулярних факторів в процесі розвитку гіпертрофії міокарда та зв'язок її ефектів з функціональними та морфологічними проявами практично не досліджена. Більшість авторів вивчають прояви та механізми гіпертрофічних перетворень міокарда в 1-2 термінах експерименту, що не дозволяє охарактеризувати перебіг процесу, послідовність та регуляцію ключових молекулярних механізмів, вирізнити можливості зворотнього розвитку гіпертрофії, що важливо для клінічної медицини.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках тем НДР відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України: «Системні та молекулярно-генетичні дослідження механізмів розвитку гіпертрофії та недостатності серця» (№ 01104004753), «Генетичні та епігенетичні механізми регуляції вісцеральних функцій в нормі і при патології» (№ 11-3-12). «Дослідження механізмів ремоделювання міокарда в патогенезі розвитку серцевої недостатності та її корекції» (№ держреєстрації 0114U007233) та лабораторії молекулярної біології МЦ

АМЕД НАНУ «Молекулярні механізми цитопротекції та гіпертрофії міокарду при гіпоксичному ремоделюванні» (№ держреєстрації 0108U011157), «Роль мікроРНК в регуляції клітинної та метаболічної адаптації при впливі гіпоксії» (№ держреєстрації 0117U004053).

Мета і завдання дослідження: охарактеризувати роль інсуліноподібного фактору росту-1 у молекулярно-генетичних механізмах гіпертрофії міокарда у щурів в динаміці її розвитку.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. Визначити функціональні та морфологічні зміни в серці при короткотривалому впливі ізопротеренолу у щурів Wistar та SHR.
2. Дослідити експресію мРНК IGF1, білків pAkt, SERCA2, дистрофіну, HSP60 та мікроРНК1 в міокарді при короткотривалому впливі ізопротеренолу у щурів Wistar та SHR.
3. Визначити функціональні та морфологічні зміни в серці в динаміці розвитку гіпертрофії лівого шлуночка у щурів SHR 6 та 18 міс у порівнянні з щурами Wistar відповідного віку.
4. Встановити динаміку змін експресії мРНК та білка IGF-1, мікроРНК1 при гіпертрофії лівого шлуночка у щурів SHR 6 та 18 міс у порівнянні з щурами Wistar відповідного віку.
5. Охарактеризувати роль IGF-1-залежних сигнальних шляхів та регуляторних факторів, структурних білків у динаміці розвитку гіпертрофії міокарда у щурів.

Об'єкт дослідження – молекулярно-генетичні механізми змін структури і функції міокарда при його гіпертрофії.

Предмет дослідження – динаміка функціональних, структурних проявів і молекулярно-генетичних механізмів, асоційованих з IGF1-залежними та регуляторними шляхами, при розвитку гіпертрофії міокарда у щурів.

Наукова новизна отриманих результатів. В роботі вперше охарактеризовано динаміку та мікроРНК-1-опосередковану регуляцію одного з ключових регуляторів гіпертрофії серця – IGF1 – при терміновій, сталій та дизрегульованій гіпертрофії. Вперше встановлено тісну асоціацію експресії мРНК і білка IGF-1 та пов'язаних з ним білків Akt, HSP60, SERCA2 з розвитком і зворотнім розвитком термінової гіпертрофії. Вперше показано, що стала гіпертрофія міокарда у щурів SHR асоційована з пригніченням реакції IGF1-залежних та регуляторних шляхів на прогіпертрофічний стимул на тлі підвищеної експресії білка SERCA2, що забезпечує скоротливу функцію, а також наявністю незворотніх структурних перетворень міокарда. Вперше продемонстровано прогресивне наростання дефіциту структурного білка дистрофіну в динаміці розвитку гіпертрофії. Вперше виявлено порушення мікроРНК-1-залежної регуляції експресії IGF-1 при сталій гіпертрофії, порушення дозрівання мікроРНК-1

при старінні, що може бути причиною дизрегуляторних структурних та функціональних змін в гіпертрофованому міокарді.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів. Результати роботи мають як теоретичну (фундаментальну), так і практичну цінність. Визначення змін функціональних та структурних проявів гіпертрофії міокарда на різних стадіях її розвитку та молекулярно-генетичних механізмів, асоційованих з цими перетвореннями є внеском до фундаментальних відомостей щодо розвитку гіпертрофії міокарда, обґрунтовує можливості її зворотнього розвитку або ризику ремоделювання міокарда і серцевої недостатності. Результати роботи розширюють існуючі уявлення про IGF-1-залежні механізми та їх регуляцію мікроРНК-1 при гіпертрофії міокарда та при старінні. Охарактеризовані в роботі механізми охоплюють вплив на серце різноманітних чинників, в тому числі, фізичних навантажень, артеріальної гіпертензії, адренергічних стимулів, стресу тощо, і, таким чином, її результати можуть застосовуватися у спортивній, екстремальній медицині та кардіології. Отримані відомості можуть бути впроваджені в навчальний процес освітніх закладів біологічного, медичного, педагогічного та спортивного профілю, зокрема, в такі дисципліни, як фізіологія, патофізіологія, кардіологія, спортивна медицина, генетика, основи безпеки життєдіяльності тощо.

Особистий внесок здобувача. Здобувачкою спільно з науковим керівником було сформульовано мету і завдання дослідження, розроблено експериментальну модель і протоколи досліджень, сформульовано висновки. Автором особисто проведено всі етапи експериментальної роботи: моделювання експериментального впливу, визначення параметрів кардіогемодинаміки, експресії генів та білків, морфологічні дослідження, аналіз й статистичну обробку даних. Ряд експериментів було проведено спільно зі співробітниками Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, які є співавторами опублікованих робіт. Дисертанткою особисто проведено аналіз всього обсягу експериментальних даних, їх узагальнення і написання статей, а також представлення результатів на наукових конференціях та з'їздах.

Апробація результатів дисертації. Основні положення й результати дисертації були представлені та обговорені на конференціях, конгресах та профільних наукових форумах:

- ISHR Heart Failure 2012 (Beograd, Serbia, May 2012), (постерна доповідь); Frontiers in CardioVascular Biology 2014 (Barcelona, Spain, 04 - 06 Jul 2014), (постерна доповідь); ISHR Heart Failure 2016 (Florence, Italy, 21-24 May 2016), (постерна доповідь); The 51st Annual Scientific Meeting of ESCI European society of clinical investigation (Italy, Genoa, May 2017), (постерна

доповідь); Summer School on Basic Cardiovascular Science (18-20 June 2017, European Heart House, Sophia - Antipolis, France), (постерна доповідь); The 52st Annual Scientific Meeting of ESCI European society of clinical investigation "Precision medicine for healthy ageing" (Spain, Barcelona, May 2018), (постерна доповідь); Europhysiology 2018 (London, UK, 14-16 September 2018), (постерна доповідь).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 18 наукових працях, в тому числі 7 статей у фахових наукових журналах, а також 11 тез доповідей, в тому числі 8 – на зарубіжних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису методів досліджень, результатів досліджень, аналізу й узагальнення результатів, висновків, списку використаної літератури, що включає 198 праць. Робота викладена на 148 сторінках машинописного тексту, проілюстрована 57 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи досліджень. Експериментальна частина дослідження проведена на 150 щурах ліній Wistar та SHR віком 6 та 18 місяців. Тварин отримували із віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де вони утримувалися за стандартних умов. Дослідження проведені з урахуванням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986).

1. Експериментальна модель термінової гіпертрофії міокарда шляхом β -адренергічної стимуляції. Тварини отримували ін'єкції агоніста β -AP ізопротеренолу (Sigma, USA) у концентрації 5 мг/кг (в об'ємі 0,5 мл) підшкірно, щоденно протягом 7 діб. Групою порівняння слугували тварини, яким аналогічним чином вводили фізіологічний розчин NaCl. Фізіологічні дослідження та відбір зразків здійснювали в динаміці.

2. Визначення параметрів кардіодинамічних показників *in vivo* проводили за допомогою стандартного 2F мікрокатетера для реєстрації тиску-об'єму з відстанню між сигнальними електродами у 9,0 мм (SPR-838; Millar Instruments, Houston, TX). Катетер вводили через сонну артерію ретроградно у порожнину лівого шлуночка для запису показників кардіогемодинаміки в умовах закритої грудної порожнини за допомогою ChartTMv.5.4.2 (AD Instruments, Millar Instruments, Houston, TX). Співвідношення тиску-об'єму у лівому шлуночку серця аналізували за допомогою програмного забезпечення PVAN 3.6 (AD Instruments, Millar Instruments, Houston, TX) з конвертацією відносних одиниць об'єму (RVU) в абсолютні одиниці об'єму за допомогою формули ($\text{slope } 20,25 \cdot \text{RVU} - \text{intercept } 29,05$), згідно з рекомендаціями виробника.

3. Морфометричні та морфологічні методи досліджень. Зразки одержували під уретановим наркозом. Морфометричні індекси відносної

маси шлуночків серця визначали після закінчення функціональних досліджень, **індекс маси серця** вираховували як відношення маси серця (мг) до маси тіла тварини (г). Для визначення **розвитку фіброзу** в міокарді застосовувався метод виявлення сполучної тканини за Ван-Гізоном [Меркулов Г.А., 1955]. Пофарбовані зрізи сканували, отримані цифрові зображення аналізували за допомогою спеціалізованої морфометричної програми ImageJ (National Institutes of Health, USA). Для **електронної мікроскопії зразків** тканину серця фіксували протягом 120 хв розчином наступного складу: параформальдегід (2%), глютаральдегід (2,5%) в 0,1 М фосфатному буфері з подальшою постфіксацією 1% буферним розчином осмію тетроксиду. Після дегідратації зразки заливали епоксидною смолою. Ультратонкі зрізи клітин контрастували уранілацетатом та цитратом свинцю. Зразки досліджували з використанням електронного мікроскопу Jem – 100 CX (Японія).

4. Визначення рівня експресії білків методом імуноблотингу. Зразки вилучали у наркотизованих тварин, подрібнювали в рідкому азоті, піддавали ультразвуковій гомогенізації та лізису в лізис-буфері (50 ммоль/л Tris-HCl, 5 ммоль/л EDTA, 10 ммоль/л EGTA, 50 мкг/мл PMSF, 0,2 ммоль/л ортованадату натрію, коктейль інгібіторів протеаз (“Sigma”) – 1%). Після центрифугування зразків міокарда у супернатантах визначали вміст білка біцінхоніновим методом за допомогою набору BCA-1 (“Sigma”). Визначення експресії білків проводили за допомогою обладнання та протоколів “BIO-RAD Labs” (США), з використанням антитіл та реактивів фірм “Sigma”, “BD BioSciences” (США). Денатуровані супернатанти (по 50-100 мкг білка) розділяли методом вертикального гель-електрофорезу у системі SDS-PAGE, розділені білки переносили на PVDF-мембрани. Мембрану обробляли розчином для блокування (Western blocking solution, “Sigma”), інкубували з первинними та вторинними антитілами згідно з рекомендаціями виробника. Імунозв’язування і детекцію білків проводили за допомогою наборів реактивів ProteoQwest Colorimetric Western Blotting Kit (“Sigma”). В якості вторинних антитіл використовували видоспецифічні IgG, мічені пероксидазою. Для детекції білків використовували кольорову реакцію з розчином субстрату TMB або аміноетилкарбазолу. Інтенсивність забарвлення визначали за допомогою комп’ютерної денситометрії та представляли в у.о.

5. Виділення РНК з тканин серця. Виділення тотальної РНК із тканин серця щурів проводили із використанням фенол-хлороформного методу екстракції з використанням реагентів Sigma (США). Отримана РНК після вимірювання її концентрації за допомогою спектрофотометра використовувалася для проведення зворотної транскрипції.

6. Зворотна транскрипція та полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі. Визначення рівня мРНК IGF-1 проводили після зворотної транскрипції за допомогою ПЛР у реальному часі з використанням SYBR Green MasterMix (Life Technologies, США) та специфічних праймерів. Рівень зрілої

мікроРНК-1 визначали за допомогою зворотної транскрипції з використанням набору TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, США), специфічних петльових праймерів та 10 нг тотальної РНК. ПЛР проводилась з використанням TaqMan® MicroRNA Assays для U6 snRNA та rno-miR-1 (Life Technologies, США). Рівня незрілих мікроРНК визначали за допомогою зворотної транскрипції із використанням рандомних гексамерних праймерів та TaqMan® High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США), а ПЛР проводилась із використанням реагентів SYBR Green (Applied Biosystems, США). Для визначення рівня первинних мікроРНК-1 використовували кДНК, з наступною ПЛР із застосуванням TaqMan® MicroRNA Assay та реагентів TaqMan (Life Technologies, США).

7. Статистичний аналіз даних проводили за методами варіаційної статистики, прийнятими для медико-біологічних досліджень. За умови нормального розподілу та гомоскедастичності вибірок використовували однофакторний дисперсійний аналіз з апостеріорними попарними порівняннями з поправкою Бонфероні. За інших умов використовувався аналіз Краскелла-Уолліса з апостеріорними попарними тестами з поправкою Бонфероні. При порівнянні параметричних даних застосовували метод t-критерію Стьюдента для незалежних величин. При порівнянні непараметричних даних застосовували U-критерій Манна-Уїтні (незалежні величини); при аналізі залежних величин – T - критерій Вілкоксона. Статистичний аналіз проводили з використанням стандартного пакету програм — Statistica for Windows 12.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Відмінність середніх величин вважалась вірогідною при рівні значущості $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Перша частина роботи присвячена дослідженню змін кардіогемодинаміки, морфології серця дорослих щурів лінії Wistar при ізопротеренол-індукованій терміновій гіпертрофії, а також у SHR при сталій гіпертрофії. Визначали рівні експресії генів IGF-1, miRNA1 та білків IGF-1, Akt, SERCA2, HSP60 та дистрофіну.

Морфометричні зміни серця щурів. Встановлено, що адренергічна стимуляція супроводжувалася прогресивним розвитком гіпертрофії ЛШ у щурів Вістар, а після завершення введення ISO відбувалася її регресія (на 54% на 14 добу і на 98% на 30 добу). Ці зміни охарактеризовані нами як термінова ізопротеренол-індукована гіпертрофія. У SHR спостерігалася стала гіпертрофія ЛШ, а при введенні ISO відбувалося різке зростання концентричної гіпертрофії ЛШ вже у перші 3 доби, що призводило до значної летальності (65% тварин). Зворотнього розвитку гіпертрофії, на відміну від щурів Вістар, не відбувалося. Через добу після завершення введення ISO спостерігали фібротичні зміни в серці щурів обох ліній, показники були вищими у щурів лінії Wistar, що може свідчити про

активність компенсаторних механізмів, які зменшують адренергічні пошкодження серцевого м'яза, у SHR.

Кардіогемодинаміка зміни. Для оцінки впливу розвитку гіпертрофії на функцію серця було проведено експерименти на щурах Wistar при впливі ізопротеренолу, який викликав термінову ГМ, та SHR зі сталою гіпертрофією лівого шлуночка. Функцію серця оцінювали через 7 діб експерименту.

Було встановлено вірогідне погіршення показників *насосної функції серця*, а саме, хвилинного об'єму крові, ударного об'єму, фракції викиду, ударної роботи (табл. 1). У щурів SHR зі сталою гіпертрофією ЛШ показники насосної функції також були зниженими, особливо ударна робота, але при введенні ISO цей показник відновлювався (табл.1).

Погіршення *систоличної функції* у щурів Вістар при розвитку гіпертрофії супроводжувалось змінами таких параметрів: *кінцево-систоличного об'єму* (КСО), *кінцево-систоличного тиску* (КСТ). У SHR прогресували порушення КСО, *максимальної швидкості зміни тиску* (dP/dt_{max}), однак КСТ відновлювався. При дії ISO у SHR максимально зростали показники КСО, а dP/dt_{max} відновлювалася до норми (табл.1). Показники *діастолічної функції* при терміновій гіпертрофії у Вістар покращувалися за параметрами *кінцево-діастолічного об'єму* (КДО), *кінцево-діастолічного тиску* (КДТ), але *максимальна швидкість розслаблення міокарду* ($dP_{dt\ min}$), *ізоволюмічна константа розслаблення лівого шлуночка* τ_w за Вайсом (τ_w) зменшувалися. При сталій гіпертрофії у щурів SHR всі показники діастолічної функції зростали, але при дії ISO збільшувався КДТ, спостерігалось зниження τ_w на 25% (табл.1). Таким чином, термінова гіпертрофія призводила до порушень насосної, систолічної, частково – діастолічної функції серця. Стала гіпертрофія характеризувалась частковим відновленням насосної та систолічної функції, покращенням діастолічної функції. Введення адренергічного стимула на тлі сталої гіпертрофії частково покращувало діастолічну, меншою мірою - систолічну і насосну функції міокарда. Однак окремі параметри порушення функції не зазнавали компенсації або погіршувалися в динаміці гіпертрофії міокарда.

Показник	Wistar	Wistar ISO	SHR	SHR ISO
Кількість серцевих скорочень (уд/хв)	358,07 ± 2,86	333,05 ± 1,22*	296,2 ± 5,96**	362,56 ± 4,6#
Кінцево-систолический об'єм (мкл)	138,14 ± 1,84	230,62 ± 0,64*	325,89 ± 12,96**	324,4 ± 4,2
Кінцево-діастолічний об'єм (мкл)	270,74 ± 1,36	307,9 ± 0,74*	324,53 ± 12,93**	402,66 ± 4,99#
Кінцево-систолический тиск (мм.рт.ст)	92,85 ± 1	72,87 ± 1,17*	98,78 ± 1,98	157,87 ± 1,71#
Кінцево-діастолічний тиск (мм.рт.ст)	5,21 ± 0,34	4,61 ± 0,3	2,17 ± 0,8*	5,11 ± 0,54#
Ударний об'єм (мкл)	144,38 ± 1,44	88,88 ± 0,74*	100,16 ± 1,32**	107,11 ± 1,44
Фракція викиду (%)	50,39 ± 0,62	28,4 ± 0,16*	28,1 ± 0,55**	26,44 ± 0,62
Хвилинний об'єм крові (мкл/хв)	51723,69 ± 587,72	29817,96 ± 227,84*	31436,76 ± 585,6**	39586,89 ± 540#
Ударна робота (мм.рт.ст*мкл)	10129,34 ± 110,74	4381,33 ± 78,58*	2647,7 ± 114,75**	8986,94 ± 281#
Артеріальна жорсткість (мм.рт.ст/мкл)	0,71 ± 0,054	0,82 ± 0,01*	1,03 ± 0,1**	1,67 ± 0,31#
Максимальна швидкість зміни тиску (dPdtmax) (мм.рт.ст/сек)	12648,1 ± 253,75	11078,02 ± 271,15*	7933,06 ± 577,73**	12006,47 ± 312,12#
Максимальна швидкість розслаблення міокарду (dPdt min) (мм.рт.ст/сек)	-5607,3 ± 81,76	-3744,4 ± 92,78*	-6610,01 ± 298,77**	-5605,76 ± 105,33#
Тау за Вайсом (мсек)	9,08 ± 0,13	8,54 ± 0,073*	12,58 ± 0,82**	9,49 ± 0,32#

Табл.1. Кардіогемодинамічні показники роботи серця при впливі ізопротеренолу у щурів Wistar та SHR віком 6 міс (n= 9-12 в кожній групі). *P<0.05, ** P<0.01 проти Wistar, # P<0.05 проти SHR.

Ультраструктурні зміни міокарда. Введення ISO призводило до вогнищевих порушень в міокарді як в групі Wistar, так і в групі SHR, зокрема, порушень архітекtonіки кардіоміоцитів з контрактурами та лізисом міофіламентів, деструкцією внутрішніх мембран мітохондрій, частковим руйнуванням сарколеми аж до вивільнення клітинних органел в міжклітинний простір, та розвитком фіброзних перетворень (рис.1).

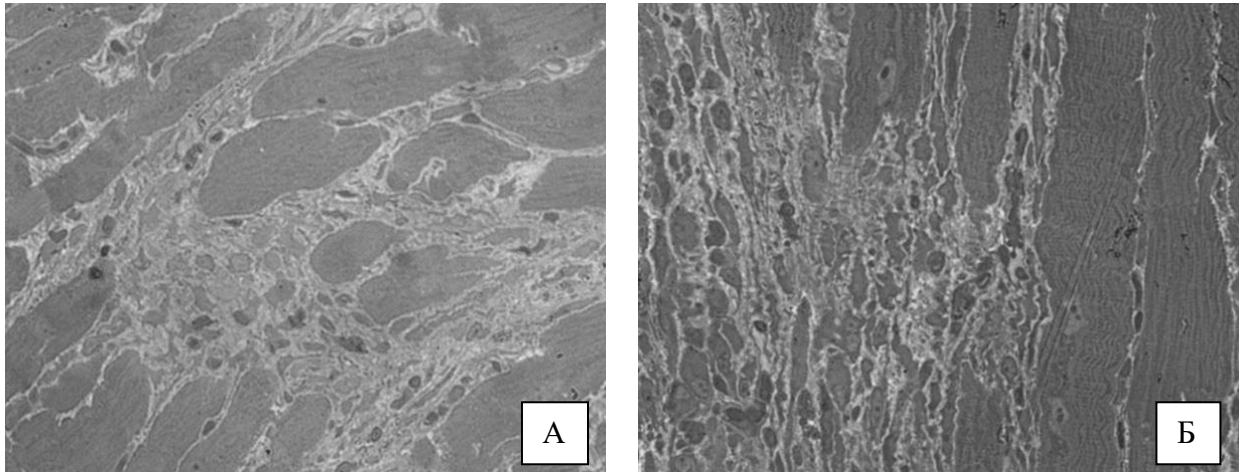


Рис.1 Напівтонкі зрізи міокарду лівого шлуночка щурів групи Wistar (А) та групи SHR (Б) після введення ізопротеренолу. Деструкція кардіоміоцитів супроводжується масованим накопиченням елементів сполучної тканини в міжклітинному просторі. 3б. х 40.

Зміни в більшості кардіоміоцитів носили зворотній характер, проте вказували на можливі порушення функції цих клітин, а саме: набряк мітохондрій, які часто утворювали скупчення в області ядра та/або субсарколемального просторі, набряк цистерн саркоплазматичного ретикулума, локальні ураження міофіламентів, наявність великої кількості аутофагічних вакуолей (рис.2А). Порушення притоку крові до тканин ЛШ серця та масоване формування виростів та складок ендотеліоцитів мікросудин в міокарді, що може бути причиною такого явища, як майже повна відсутність просвіту в окремих капілярах піддослідних тварин групи Wistar на фоні введення ізопротеренолу (рис.2В, С, D).

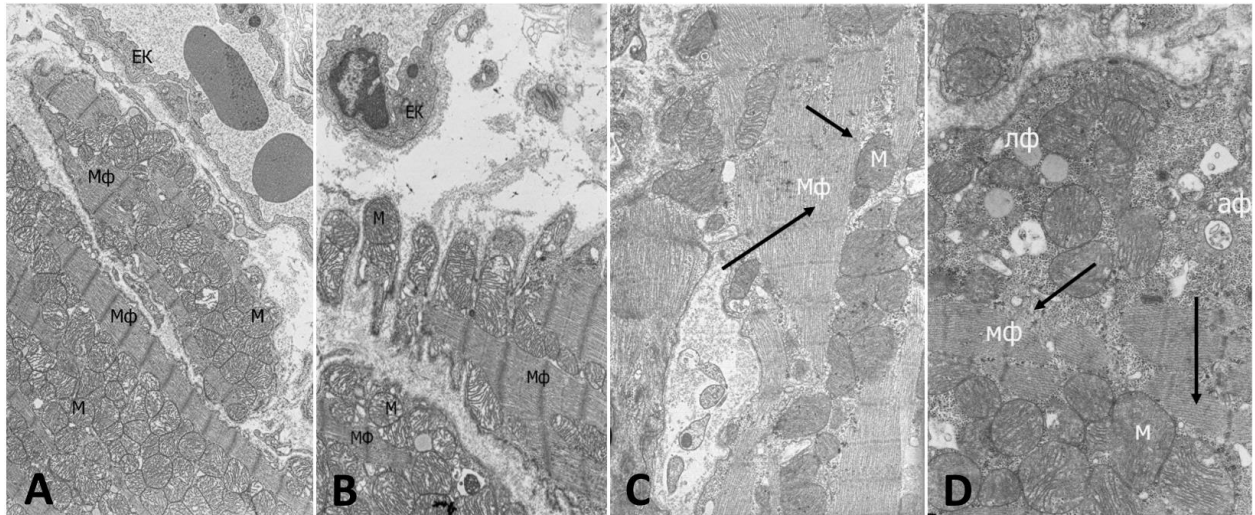


Рис.2. Міокард лівого шлуночка серця щурів групи Wistar (A) та SHR (B,C,D) після введення ізопроterenолу. Зб. x7200. Лізис міофіламентів (стрілки), руйнація крист в частині мітохондрій. М - мітохондрія; Мф – міофіламенти; Лф – ліпофусцин; Ав – аутофагічна вакуоля; ЕК - ендотелій капіляра.

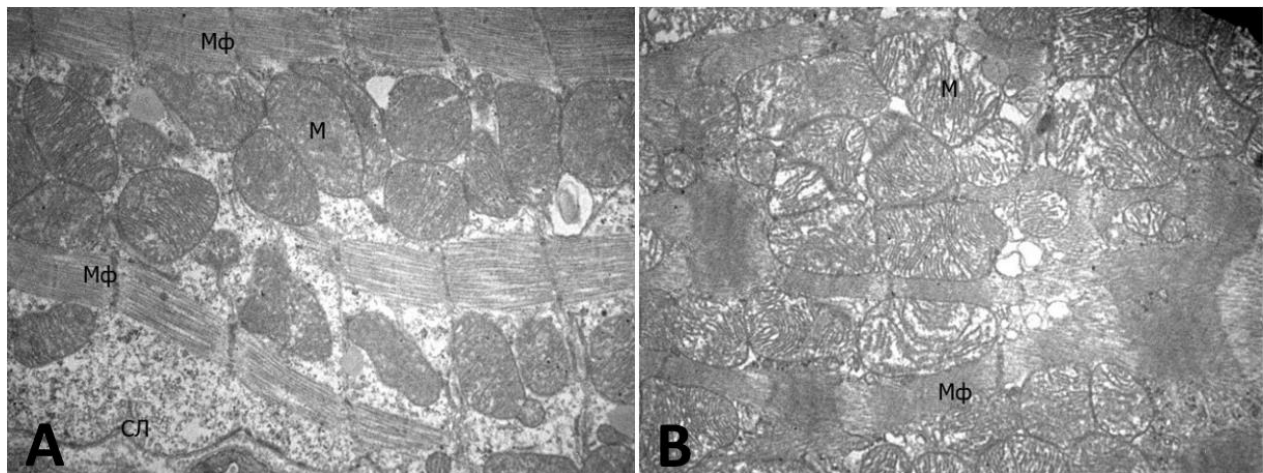


Рис.3. - Міокард лівого шлуночка серця щурів групи Wistar після введення ізопроterenолу. Набряк цитоплазми в субсарколемальному просторі, лізис міофіламентів, набряк мітохондрій, що часто утворюють скупчення в різних ділянках кардіоміоцита (А) Зб. x 10000; Виражені контрактири, що охопили всі міофіламенти в одному кардіоміоциті (Б). Зб. x 7200. Мф - міофіламенти, М - мітохондрія; СЛ – сарколема.

Зміни експресії структурних, сигнальних та регуляторних білків у шлуночках серця щурів Wistar та SHR в динаміці гіпертрофії. В міокарді щурів Вістар *експресія білка IGF1* зростала при дії ISO з максимумом на 3 добу, а після завершення впливу прогресивно зменшувалася (рис. 4, А). Через 30 діб спостерігали і зменшення *експресії mPDK IGF1* (рис. 4, Б). При сталій гіпертрофії у SHR показники *експресії*

mPHK IGF1 були знижені, а індукції *mPHK* і білка при дії ISO не відбувалося (рис. 4, А,Б).

МікроРНК-1 є ключовою, що експресується в міокарді, вона відіграє важливу роль у роботі серця, а також негативно регулює експресію IGF1. Введення ISO викликало різке падіння експресії мікроРНК-1 у міокарді щурів Wistar та SHR з частковим відновленням на 7 і 30 добу (рис. 4, В), що є регуляторним сигналом для забезпечення індукції IGF1. Незважаючи на збереження такої відповіді мікроРНК-1 на ISO у SHR, індукція IGF1 у останніх не відбувалася, що вказує на порушення (гальмування) цієї регуляторної ланки при сталій гіпертрофії.

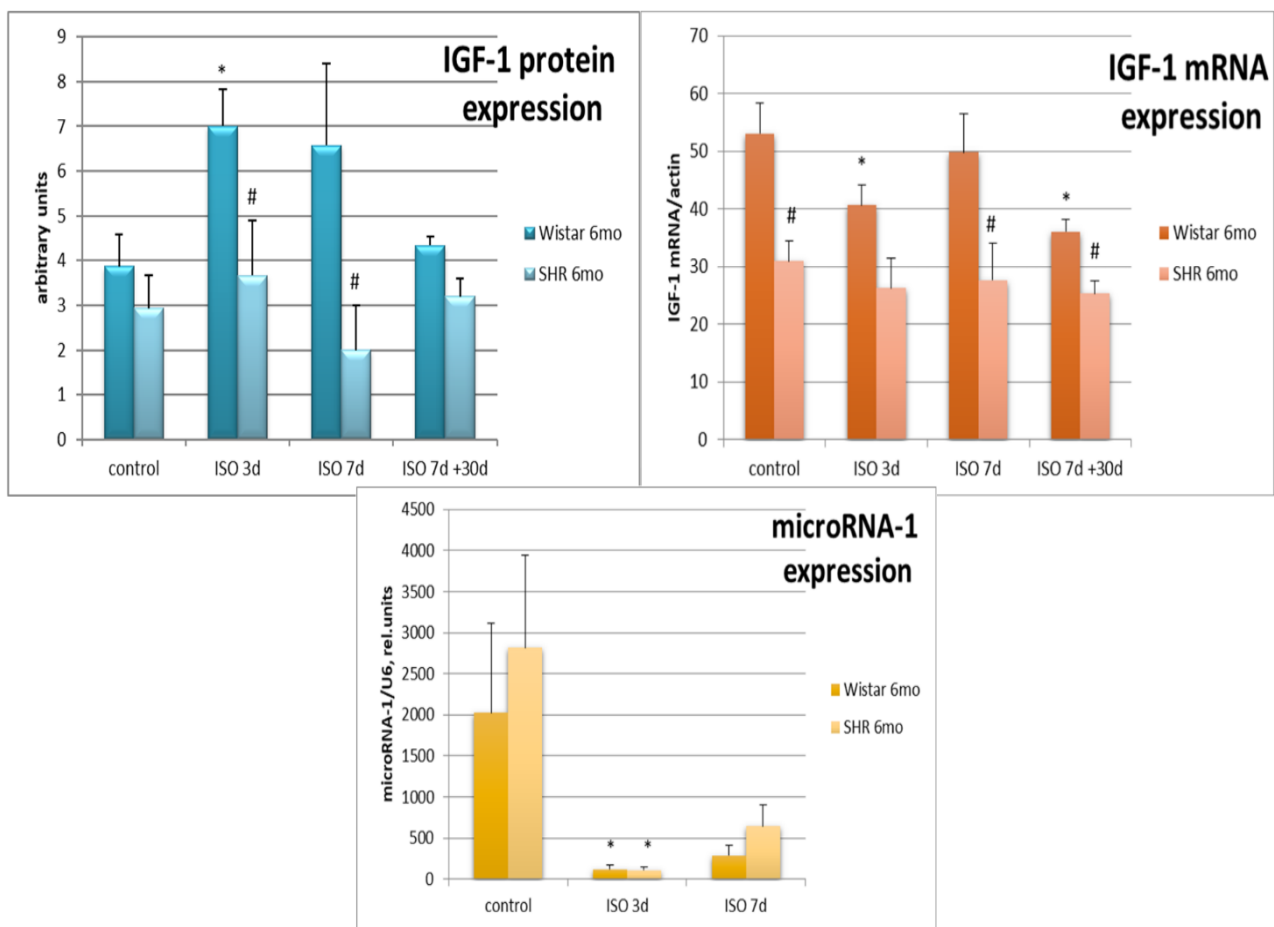


Рис. 4. - Експресія білка *IGF1* у лівому шлуночку серця щурів Wistar та SHR при ізопротеренол-індукованій гіпертрофії (А); Експресія *mPHK IGF1* у лівому шлуночку серця щурів Wistar та SHR при ізопротеренол-індукованій гіпертрофії (В); Експресія мікроРНК-1 у лівому шлуночку серця щурів Wistar та SHR при ізопротеренол-індукованій гіпертрофії (С) * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем, # $P < 0,05$ порівняно з щурами Wistar.

Подібним чином до експресії IGF-1 при дії ISO також змінювалася експресія асоційованих з ним сигнальних білків: експресія білка HSP60, кофактора рецепторів IGF-1, не відрізнялася в міокарді щурів з наявністю сталої гіпертрофії та без неї. Однак у відповідь на прогіпертрофічний стимул експресія цього кофактора зростала тільки у щурів лінії Wistar (рис.5А). Експресія білка Akt в міокарді взагалі була редукованою у SHR і не змінювалася при дії ISO (рис. 5, Б).

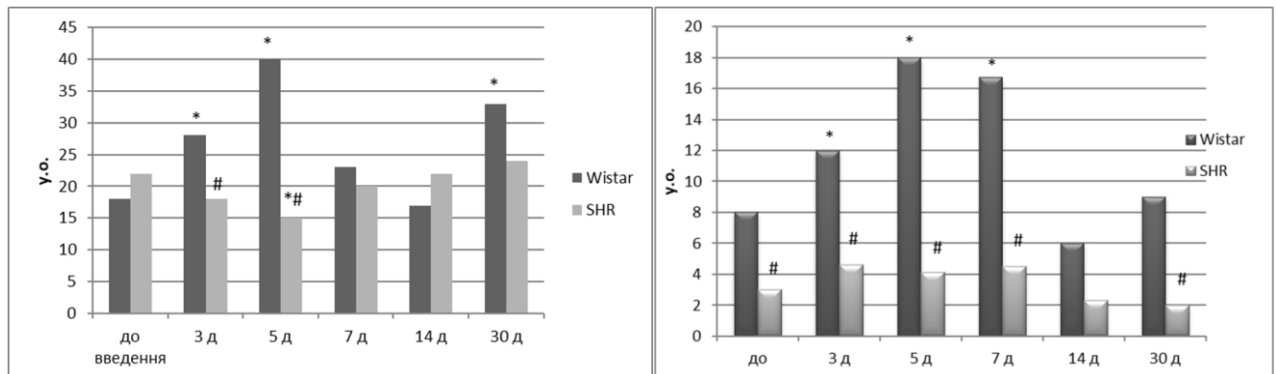


Рис.5. - Експресія білка HSP60 у лівому шлуночку серця щурів Wistar та SHR при ізопротеренол-індукованій гіпертрофії (А); Експресія білка Akt у лівому шлуночку серця щурів Wistar та SHR при ізопротеренол-індукованій гіпертрофії (В). * $P < 0.05$ порівняно з вихідним рівнем, # $P < 0.05$ порівняно з щурами Wistar.

Згідно з цими результатами, наявність сталої гіпертрофії у SHR асоціювалася з пригніченням індукції сигнальних прогіпертрофічних білків у відповідь на адренергічний стимул. Це може свідчити про зсув реакції при прогресії гіпертрофії від проліферативної відповіді до підтримання сталою функціонування міокарда. Таким чином, при терміновій гіпертрофії проліферативні механізми активувалися в ранні терміни дослідження (3-5 доба), потім вони зазнавали обмеження і навіть редукувалися до 30 діб експерименту.

Експресія структурного білка дистрофіну, який попереджує ламкість мембран кардіоміоцитів при скороченні, при впливі ISO, однак, не зростала, а після його закінчення прогресивно знижувалася (рис. 6, А). Одержані показники відповідали морфологічним проявам пошкодження тканини серця і розвитку фіброзу міокарда. SHR характеризувалися нестачею експресії дистрофіну, що корелювало з їх значною летальністю при адренергічній стимуляції. Індукція експресії дистрофіну при дії ISO у цих щурів також була значно порушеною, максимальні показники були у 2,2 раза меншими, ніж у щурів Wistar.

Виявлено зростання експресії залежного від IGF-1 білка SERCA2 у міокарді Wistar протягом 5-7-ї доби розвитку термінової гіпертрофії,

показники залишалися підвищеними до 14-ї доби (рис. 6, Б). В той же час у SHR експресія SERCA2 була більш високою протягом всього терміну дослідження, і додатково зростала на 5-у добу введення ISO (рис. 6, Б).

Одержані результати можуть свідчити, що при терміновій гіпертрофії і сталій гіпертрофії підтримується висока експресія скоротливих білків, зокрема SERCA2, незважаючи на обмеження прогіпертрофічних сигнальних шляхів, а експресія високомолекулярних структурних білків недостатньо забезпечена.

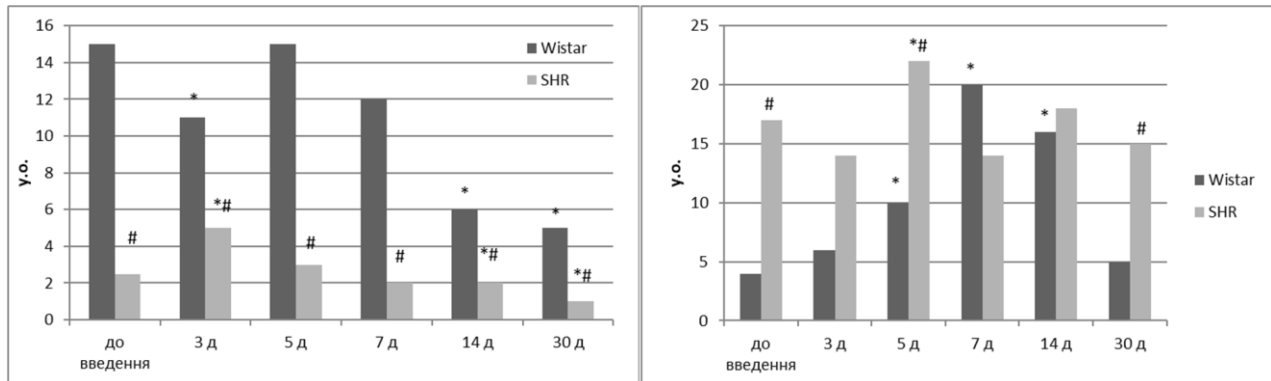


Рис. 6. – Експресія білка дистрофіну у ЛШ серця щурів Wistar та SHR при ізопротеренол-індукованій гіпертрофії (А); Експресія білка SERCA2 у міокарді щурів Wistar та SHR при ізопротеренол-індукованій гіпертрофії. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем, # $P < 0,05$ порівняно з щурами Wistar.

Друга частина роботи присвячена дослідженням змін кардіодинаміки, морфології серця щурів лінії SHR віком 18 міс при дизрегульованій гіпертрофії міокарда, індукованій збільшеним постнавантаженням на серце, у порівнянні з щурами віком 6 міс і щурами лінії Wistar аналогічного віку. Вивчали рівні експресії мікроРНК-1 та білка IGF-1.

Морфометричні зміни. Встановлено, що індекс маси лівого шлуночка у щурів лінії SHR був вищим ніж у щурів Wistar ($3,18 \pm 0,20$ та $2,05 \pm 0,11$ відповідно; $P = 0,001$). При розрахунку співвідношення між масами лівого і правого шлуночків у щурів лінії SHR був вищим на 15% відсотків ($4,69 \pm 0,44$ та $5,39 \pm 0,52$). Встановлено, що з віком у серці щурів лінії SHR розвивався значний фіброз, який становив 18,1% від площі лівого шлуночка в порівнянні з 1,8% у щурів лінії Wistar ($P < 0,05$).

Кардіогемодинамічні зміни. У передстаречому віці щури лінії SHR характеризуються наявністю змін структури і функції серця, які відповідають розвитку перших стадій патологічного ремоделювання з переважанням гіпертрофії, фіброзу міокарда, погіршенням насосної, діастолічної, та систолічної функцій серця. При визначенні кардіогемодинамічних показників у 18-місячних щурів Wistar і SHR були виявлені вікові зміни з суттєвими відмінностями у досліджуваних групах тварин (табл.2)

Показник	Wistar 6 міс	Wistar 18 міс	SHR 6 міс	SHR 18 міс
Кількість серцевих скорочень (уд/хв)	358,07 ± 2,86	356,79 ± 3,1	296,2 ± 5,96**	302,66 ± 6,1
Кінцево-систолический об'єм (мкл)	138,14 ± 1,84	364,75 ± 2,4 *	325,89 ± 12,96	333,1 ± 10,34
Кінцево-діастолічний об'єм (мкл)	270,74 ± 1,36	466,17 ± 4,6 *	324,53 ± 12,93**	350,35 ± 11,3
Кінцево-систолический тиск (мм.рт.ст)	92,85 ± 1	123,49 ± 1,1 *	98,78 ± 1,98**	77,25 ± 1,7#
Кінцево-діастолічний тиск (мм.рт.ст)	5,21 ± 0,34	7,79 ± 0,56*	2,17 ± 0,8**	3,9 ± 0,5 #
Ударний об'єм (мкл)	144,38 ± 1,44	135,83 ± 2,79	100,16 ± 1,32**	71,25 ± 2,1 #
Фракція викиду (%)	50,39 ± 0,62	28,03 ± 0,88 *	28,1 ± 0,55	20,13 ± 0,97#
Хвилинний об'єм крові (мкл/хв)	51723,69 ± 587,72	47745,07 ± 468,9*	31436,76 ± 585,6**	21632,73 ± 348,62#
Ударна робота (мм.рт.ст*мкл)	10129,34 ± 110,74	8266,79 ± 93,5	2647,7 ± 114,75**	2480,99 ± 96,41
Артеріальна жорсткість (мм.рт.ст/мкл)	0,71 ± 0,054	1,24 ± 0,036*	1,03 ± 0,1**	1,26 ± 0,13
Максимальна швидкість зміни тиску (dPdt) (мм.рт.ст/сек)	12648,1 ± 253,75	13160,44 ± 268,7	7933,06 ± 577,73**	3717,27 ± 244,96#
Максимальна швидкість розслаблення міокарду (dPdt min) (мм.рт.ст/сек)	-5607,3 ± 81,76	-7751,96 ± 74,3*	-6610,01 ± 298,77**	-3655,32 ± 389,2 #
Тау за Вайсом (мсек)	9,08 ± 0,13	11,17 ± 0,11*	12,58 ± 0,82	12,27 ± 0,8

Таб.2. Кардіогемодинамічні показники роботи серця при впливі тривалої хронічної гіпертрофії у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). *P<0.05, ** P<0.01 проти Wistar, # P<0.05 проти SHR .

Ультраструктурні зміни міокарда. У щурів обох ліній віком 18 м виявлялась гіпертрофія кардіоміоцитів зі значними змінами архітекtonіки клітин. Зокрема, в групі Wistar ядра часто зміщувались на периферію клітин, мали значний набряк і містили вздовж внутрішньої ядерної мембрани конденсований хроматин (рис.7). Загальними для груп Wistar 18 м та SHR 18 м були вогнищеві зміни скорочувальної системи міокарда. Локально виявляли ділянки лізису та перескорочення міофіламентів. Необхідно відмітити активацію лізосомального апарату в обох дослідних

групах, також показано пошкодження міофібрил, вакуолізацію мітохондрій та набряк саркоплазматичного ретикулуму (рис.7 А, В, С), розвиток фіброзу міокарда, що і може бути підставою для виникнення систолічної, діастолічної та ендотеліальної дисфункції серця і судин у щурів SHR.

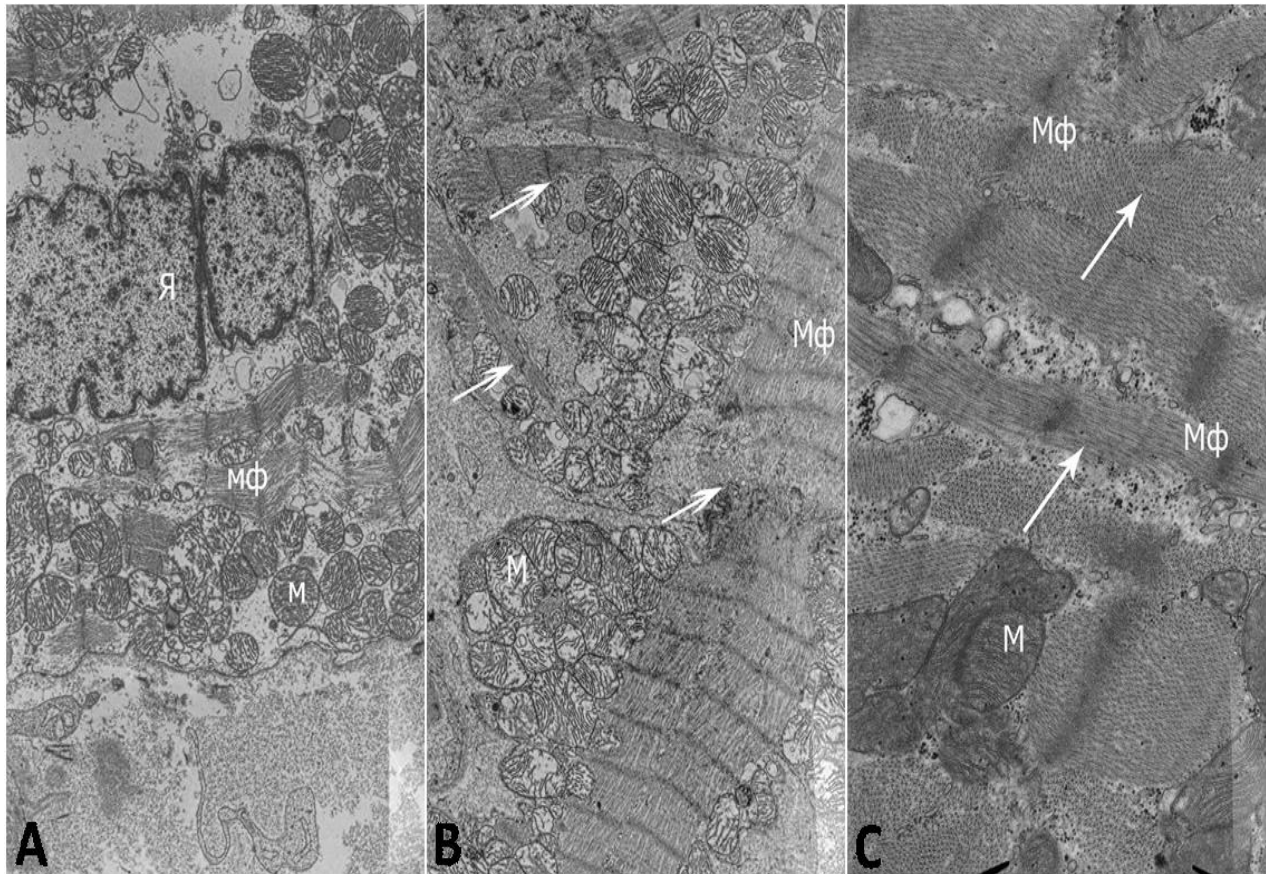


Рис.7.- (А) Міокард щура лінії SHR x3600. Перинуклеарний набряк, лізис; (В)- Міокард щура лінії SHR x3600; (С) - Міокард щура лінії Wistar x10000. Стрілки вказують на ділянки кардіоміоцитів, що містять прояви «disarray».

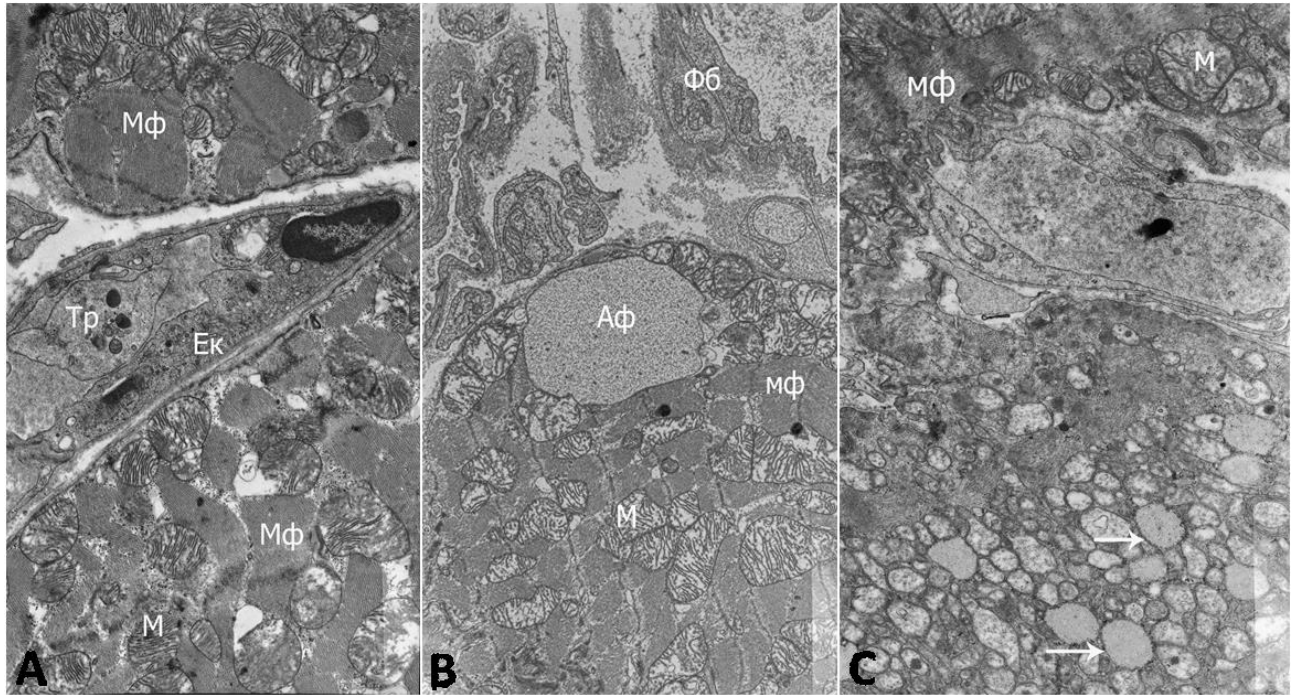


Рис.8. (А, В) міокард щура лінії Wistar (А) - капіляр заповнений форменими елементами крові, зокрема на зрізі видно тромбоцит х4800. Ек.- ендотелій капіляру, Тр.- тромбоцит. (В) - в цитоплазмі клітини велика аутофагосома, заповнена електроннощільним матеріалом.х 3600; (С) - міокард щура лінії SHR х5800. Поряд з кардіоміоцитом з вираженими контрактурами міофіламентів розташований кардіоміоцит, заповнений вакуолями, деякі з них (стрілки) є аутофагосомами.

Зміни експресії білка IGF1 та зміни експресії microRNA1 і його матурації у шлуночках серця SHR віком 18м при сталій хронічній гіпертрофії, індукованій збільшеним постнавантаженням на серце, у порівнянні з щурами лінії Wistar. Встановлено значне зростання експресії білка IGF1 в міокарді щурів Wistar та SHR порівняно з молодими тваринами (рис. 9).

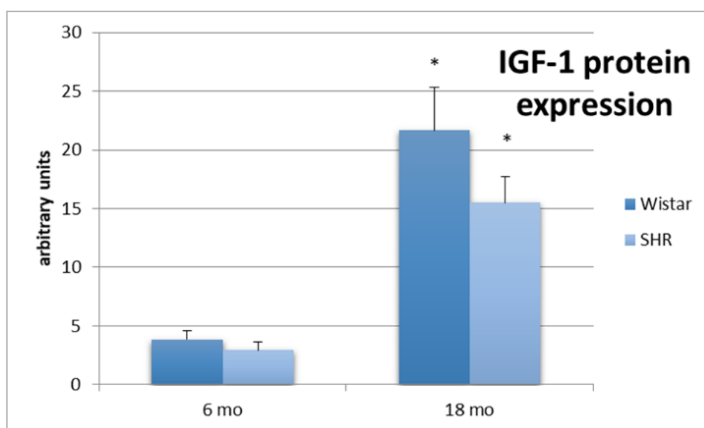


Рис. 9. - Експресія білка IGF1 у лівому шлуночку серця щурів Wistar та SHR віком 6 та 18м. *P<0,05 порівняно з вихідним рівнем, #P<0,05 порівняно з щурами Wistar.

При дослідженні змін експресії мікроРНК-1 виявлено, що у щурів передстаречого віку рівень зрілої мікроРНК-1 був в 2,5 та 3,25 рази нижчим порівняно з молодими щурами відповідної групи, більш значно показники зменшувалися у SHR ($p < 0,05$, рис. 10, А). Це могло бути причиною виявленого у них зростання експресії білка IGF1 (див. рис. 9).

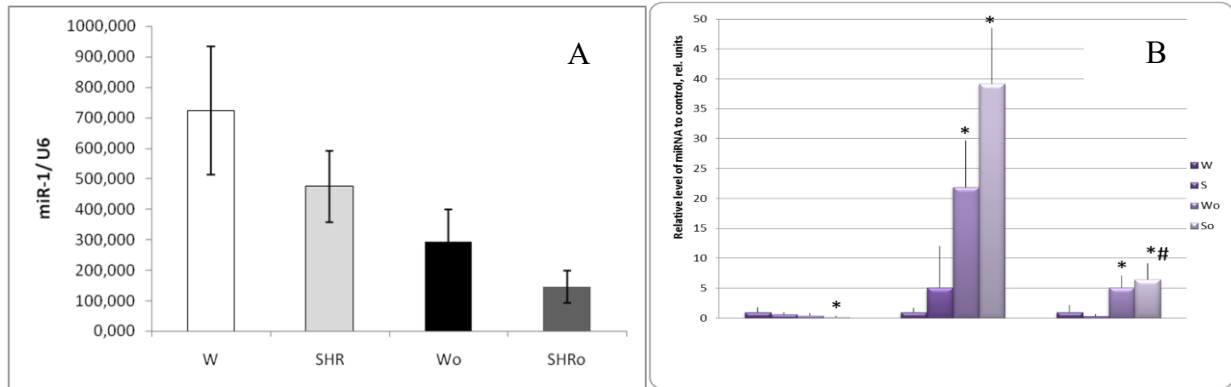
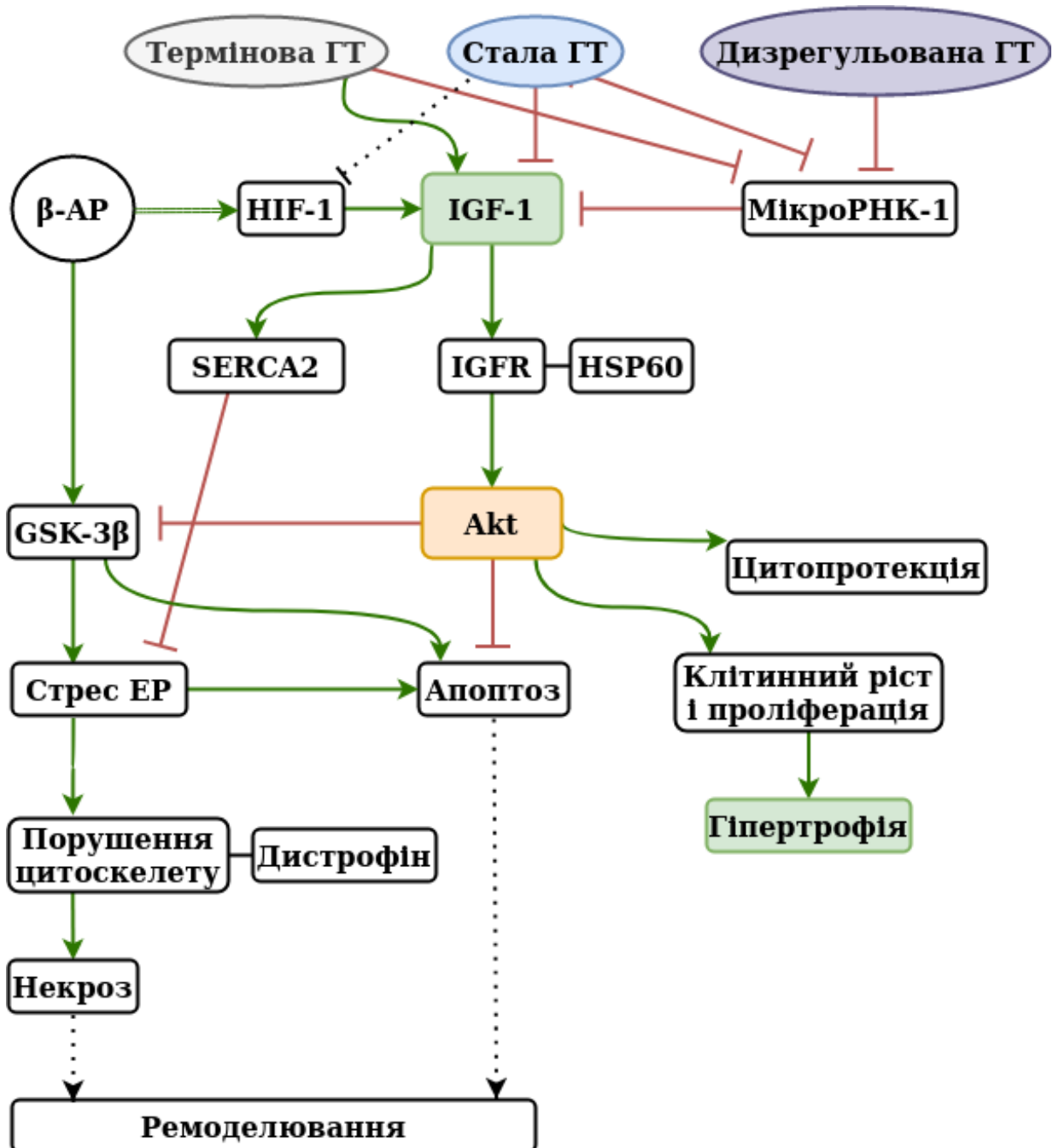


Рис.10. - Експресія мікроРНК-1 у лівому шлуночку серця щурів Wistar та SHR віком 6 та 18м (А); Рівень та активність біогенезу мікроРНК-1 у дорослих нормо- (W) і гіпертензивних (S) та старих нормо- (Wo) і гіпертензивних (So) щурів. * - відповідна група статистично значущо відрізняється від контролю (W) # - відповідна група статистично значущо відрізняється від дорослих гіпертензивних щурів (S).

Для встановлення причини зменшення рівня мікроРНК-1 було досліджено експресію її попередників, первинної та незрілої мікроРНК-1. Показано, що рівень первинної мікроРНК-1 був у 7 разів вищим у 18-місячних щурів Вістар і у 17 разів – у SHR порівняно з молодими щурами, а рівень незрілої мікроРНК-1 – у 22 і 5,9 рази, відповідно ($p < 0,05$, рис. 10, Б). Це вказує на порушення дозрівання мікроРНК-1 переважно на етапі незрілої мікроРНК у SHR і на етапі зрілої – у Вістар. Отже, можна припустити, що старіння і наявність хронічної артеріальної гіпертензії сукупно негативно впливають на рівень зрілої мікроРНК-1 та, відповідно, експресію IGF1, внаслідок чого розвивається дизрегуляція гіпертрофованого міокарда.

Одержані результати можуть бути представлені у вигляді схеми, яка характеризує участь IGF1, його мікроРНК-1-залежної регуляції та IGF1-залежних механізмів забезпечення клітинного росту, скоротливої функції, підтримання структурної цілісності кардіоміоцитів у механізмах розвитку термінової, сталої та дизрегульованої гіпертрофії міокарда.



Висновки

В дисертаційній роботі відповідно до мети і поставлених завдань було охарактеризовано функціональні, структурні прояви і молекулярно-генетичні механізми, асоційовані з IGF1-залежними та регуляторними шляхами, в динаміці розвитку гіпертрофії міокарда у щурів.

1. У щурів Вістар протягом 7 діб впливу ізопротеренолу прогресивно розвивалася гіпертрофія міокарда, яка зазнавала зворотнього розвитку після припинення адренергічної стимуляції, це охарактеризовано як термінову гіпертрофію. При наявності сталої гіпертрофії у SHR адренергічний стимул викликав подальший гіпертрофічний ріст без зворотнього розвитку, а також значну летальність.
2. Термінова гіпертрофія міокарда реалізувалася через швидку індукцію IGF-1 в міокарді (з максимумом на 3 добу), яка забезпечувалася зменшенням експресії гальмівної мікроРНК-1, з наступним зростанням експресії білків Akt, HSP70, SERCA2 та дистрофіну. Водночас спостерігалася вогнищеве порушення ультраструктури міокарда лівого шлуночка, зростання фібротичних перетворень, що може бути причиною помірного порушення діастолічної, систолічної та насосної функції серця.
3. При сталій гіпертрофії у SHR погіршувалися показники насосної та систолічної функції серця, однак вплив ізопротеренолу меншою мірою порушував функцію серця, ніж у щурів Вістар без наявності гіпертрофії, а показники насосної та діастолічної функції навіть зазнавали покращення. Разом з тим, зростання гіпертрофії в усіх експериментальних групах асоціювалося зі значним зростанням артеріальної жорсткості та фібротичних змін міокарду.
4. Стала гіпертрофія у 6-місячних SHR характеризувалася значною нестачею білків дистрофіну та Akt, зменшенням експресії мРНК IGF-1 в міокарді. У відповідь на адренергічний стимул не відбувалося індукції мРНК і білка IGF-1, білків Akt та HSP60. Нестача дистрофіну асоціювалася зі зростанням ламкості мембран кардіоміоцитів, фрагментацією і загибеллю клітин. Разом з тим, підтримувалася індукція і високий рівень експресії білка SERCA2, що могло бути основою забезпечення покращення систолічної і насосної функції серця за цих умов.
5. Тривала гіпертрофія у SHR віком 18 місяців характеризувалася зростанням морфологічних проявів ремоделювання міокарда та прогресивним погіршенням насосної, систолічної та діастолічної функції

серця у порівнянні як з 6-місячними SHR, так і з щурами Wistar віком 18 міс. Однак зростання артеріальної жорсткості більшою мірою обумовлювалося віком, ніж наявністю хронічної гіпертрофії міокарда.

6. Виявлено прогресивне порушення дозрівання і зменшення експресії мікроРНК-1, яке розвивалося з віком і було більш значним у SHR, внаслідок чого рівні білка IGF-1 в міокарді зростали незалежно від наявності гіпертрофії, що посилювало прогіпертрофічні механізми. На підставі одержаних результатів дизрегульовану гіпертрофію у SHR можна розглядати як модель розвитку серцевої недостатності на тлі артеріальної гіпертензії, механізмами якої є дизрегуляція мікроРНК-1/IGF-1 та нестача структурних білків, зокрема, дистрофіну, що посилює загибель кардіоміоцитів та фіброзне перетворення міокарда.
7. Встановлені відмінності IGF-1-залежних механізмів при терміновій, сталій та дизрегульованій гіпертрофії міокарда вказують на ключову роль цього білка у розвитку та зворотньому розвитку термінової (ізопротеренол-індукованої) та дизрегульованої гіпертрофії міокарда, в тому числі, у його структурній та функціональній перебудові, тоді як в умовах сталої гіпертрофії IGF-1-залежні механізми гальмуються.

ПЕРЕЛІК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Lapikova-Bryhinska T**, Zhukovska A, Nagibin V, Tumanovska L, Portnichenko G, Goncharov S, Portnychenko A, Dosenko V. Altered biogenesis of microRNA-1 is associated with cardiac dysfunction in aging of spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2019 Sep;459(1-2):73-82. doi: 10.1007/s11010-019-03551-6 (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз отриманих результатів, написано та подано статтю до друку).
2. Drevytska T, Morhachov R, Tumanovska L, Portnichenko G, Nagibin V, Boldyriev O, **Lapikova-Bryhinska T**, Gurianova V, Dons'koi B, Freidin M, Ivanisenko V, Bragina EY, Hofestädt R, Dosenko V. shRNA-Induced Knockdown of a Bioinformatically Predicted Target IL10 Influences Functional Parameters in Spontaneously Hypertensive Rats with Asthma. *J Integr Bioinform.* 2018 Dec 10;15(4):20180053. doi: 10.1515/jib-2018-0053. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження змін кардіогемодинамічних показників роботи серця у складі робочої групи, аналіз отриманих результатів, участь у написанні статті).
3. Balatskyi VV, Macewicz LL, Gan AM, Goncharov SV, Pawelec P, Portnichenko GV, **Lapikova-Bryginska TY**, Navrulin VO, Dosenko VE, Olichwier A, Dobrzyn P, Piven OO. Cardiospecific deletion of α E-catenin leads

to heart failure and lethality in mice. *Pflugers Arch.* 2018 Oct;470(10):1485-1499. doi: 10.1007/s00424-018-2168-2 (Здобувачем проведено експериментальні дослідження у складі робочої групи, проведено аналіз отриманих результатів).

4. Портниченко А. Г., Василенко М. І., **Лапікова-Бригінська Т. Ю.**, Бабічева В. В., Портніченко Г. В., Колчева М. Г., Портніченко В. І. IGF-1-залежні протекторні механізми при гіпоксії та експериментальному діабеті. *Український журнал медицини, біології та спорту* – 2018, 3(7):243-246. DOI: 10.26693/jmbs 03.07.243 (Здобувачем проведено експериментальні і молекулярні дослідження, аналіз отриманих результатів, участь у підготовці матеріалу до публікації).

5. **Лапікова-Бригінська Т.Ю.**, Портніченко Г.В., Гончаров С.В., Василенко М.І., Портниченко А.Г. Функціональні зміни та експресія прогіпертрофічних білків при ремоделюванні лівого шлуночка серця у щурів // *Патологія, реабілітація, адаптація.* – 2016, 14(1-3):1-5. (Здобувачем проведено експериментальні і молекулярні дослідження, аналіз отриманих результатів, участь у підготовці матеріалу до публікації).

6. Portnychenko A.H. Cardiac hypoxic remodeling and preconditioning impact on protein kinase B (Akt) expression in left and right heart ventricles / Portnychenko A.H., **Lapikova-Bryhinska T.Yu.**, Vasylenko M.I., Portnichenko H.V., Maslov L.N., Moibenko O.O. // *International Journal of Physiology and Pathophysiology.* 2014. – 5, №4. – P. 345-354. (Здобувачем проведено експериментальні і молекулярні дослідження, аналіз отриманих результатів, прийнято участь у написанні статті).

7. **Лапікова-Бригінська Т.Ю.** Вікові зміни структури і функції серця у спонтанно-гіпертензивних щурів / Лапікова-Бригінська Т.Ю., Гончаров С.В., Портніченко Г.В., Тумановська Л.В., Портниченко А.Г., Досенко В.Є., Мойбенко О.О. // *Вісник морфології.* – 2014. – 20, №2. – С.383-388. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз отриманих результатів, написано та подано статтю до друку).

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Babicheva V., Portnychenko A., Vasylenko M., **Lapikova-Bryhinska T.**, Portnichenko V. Signal ways of hypoxia-induced cytoprotection. 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation, Yaremche, 18-21 June 2019. *Proceedings.*–Yaremche, 2019. – P. 50.

2. Portnychenko A, Vasylenko M, Babicheva V, **Lapikova-Bryhinska T**, Kolcheva M, Nosar V, Portnichenko V. P526 Signal ways of hypoxia-induced cardioprotection in diabetic heart. *Frontiers in CardioVascular Biology* 2018, Vienna, Austria, 20-22 Apr 2018. *Cardiovascular Research.* 114(suppl_1):S128, APR 2018 DOI: 10.1093/cvr/cvy060.383

3. Портниченко А.Г. Молекулярні механізми фенотипової перебудови тканин при гіпоксії та їх вікові особливості / Портниченко А.Г., Василенко М.І., Бабічева В.В., **Лапикова-Бригінська Т.Ю.**, Гур'янова В.Л., Портніченко Г.В., Розова К.В., Портніченко В.І. // Вікові та хронобіологічні аспекти медицини і фармації. Матер. наук.-практ. конф. з міжн. участю, Чернівці, 4-5 жовтня 2018 р. – Чернівці, БДМУ, 2018. - С. 90-91.
4. **Lapikova-Bryhinska T.**, Goncharov S., Tumanovska L., Portnychenko A., Dosenko, V. Engagement of miRNA-1/IGF 1 in age-related changes of structure and function of spontaneously hypertensive rat heart. Abstracts of the 51st Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, Genoa, Italy, 17th - 19th May 2017 Eur J Clin Invest. 2017, May; 47:176-177.
5. Portnychenko A. P1593 Hypoxic preconditioning and metabolic rebuilding in heart ventricles of diabetic rats / Portnychenko A., Vasylenko M., **Lapikova-Bryhinska T.**, Kolcheva M., Portnichenko H., Babicheva V., Ponomaryova I., Portnichenko V. // ESC Congress 2017, 26-30 Aug 2017, Barcelona, Spain. European Heart Journal. - 2017. – 38 (suppl 1). – P. ehx502.P1593. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx502.P1593>
6. **Lapikova-Bryhinska T.**, Portnychenko A., Goncharov S. Age-dependent changes in structure, functions and IGF-1/miRNA-1 regulation in hearts of spontaneously hypertensive and wistar rats. Abstracts of the 25th Anniversary of the FEPS, 168th Anniversary of French Physiological Society, Paris (France), June 29th – July 1st 2016 Acta Physiologica. – 2016, 217, Suppl S708, P32.
7. **Lapikova-Bryhinska T.**, Gurianova V., Portnychenko A., Goncharov S. The ageing and high arterial pressure change IGF-1/miRNA-1 regulation in hypertrophied myocardium of SHR and Wistar rats. Heart Failure 2016, 21-24 May 2016, Florence, Italy: P1192. European Journal of Heart Failure 18 (suppl1), 286.
8. Портниченко А.Г. Молекулярні механізми розвитку та попередження патологічних процесів у серцево-судинній системі та їх вікові особливості / Портниченко А.Г., **Лапикова-Бригінська Т.Ю.**, Портніченко Г.В., Гончаров С.В., Василенко М.І., Гарматіна О.Ю., Запара Ю.О., Гур'янова В.Л., Мойбенко О.О. // Тези доп. VII Національного. конгресу патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції», присвяченого пам'яті академіка НАНУ О.О. Мойбенка, 5-7 жовтня 2016 р., Харків. – Вид НФАУ, 2016. – С. 184.
9. Portnychenko A., **Lapikova-Bryhinska T.**, Gurianova V., Portnichenko H., Vasylenko M., Zapara Y., Portnichenko V. Preconditioning of hypertrophied heart: miR-1 and IGF-1 crosstalk. Frontiers in CardioVascular Biology 2016. Cardiovascular Research 111 (suppl 1), S22.
10. **Lapikova- Bryginska T.**, Goncharov S, Vasylenko M, Portnychenko A, Moibenko A. Isoprenaline induced heart remodelling differentially influences dystrophin and MnSOD expression in Wistar and SHR rats. Cardiovasc Res 2014; 103 (suppl 1): S89. DOI: 10.1093/CVR/CVU091.162

11. Portnychenko A, **Lapikova-Bryginska T**, Vasylenko M, Portnichenko V, Moibenko O. Cardioprotective signaling in preconditioned and hypertrophied heart. *Cardiovasc Res.* 2014; 103 (suppl 1): S66-S67. DOI: 10.1093/CVR/CVU091.48.

АНОТАЦІЯ

Лапікова-Бригінська Т.Ю. Роль інсуліноподібного фактору росту 1 (IGF1) у молекулярно-генетичних механізмах розвитку гіпертрофії міокарда.-Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 «Фізіологія людини і тварин» - Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця, НАН України, Київ, 2020.

Дисертація присвячена дослідженню механізмів розвитку гіпертрофії серця: термінової, ізопротеренол-індукованої, та сталої у спонтанно гіпертензивних щурів. Досліджено функцію та структуру серця, а також зміни, що відбулись на молекулярно-генетичному рівні. Вперше охарактеризовано розвиток та зворотню динаміку термінової гіпертрофії у щурів Wistar та SHR та асоційовані з цим зміни експресії таргетних генів і білків, що залучені до функціонування серцево-судинної системи. В дисертаційній роботі досліджено прояви та механізм розвитку гіпертрофії лівого шлуночка серця в динаміці розвитку термінової та сталої гіпертрофії, викликані впливом адренергічних стимулів та постнавантаження при спонтанній артеріальній гіпертензії. Вперше охарактеризовано динаміку та microRNA-1-опосередковану регуляцію одного з ключових регуляторів гіпертрофії серця - IGF1 в процесі гострого та хронічного розвитку гіпертрофії. Спостерігали порушення дозрівання і зменшення експресії microRNA-1, яке розвивалося з віком і було більш вираженим у SHR, внаслідок чого рівні білка IGF-1 в міокарді зростали незалежно від наявності гіпертрофії. При внутрішньошлуночкової реєстрації тиску та об'єму за допомогою мікрокатетера встановлено, що розвиток сталої гіпертрофії у SHR супроводжувався погіршенням показників насосної та систолічної функції серця, однак вплив ізопротеренолу меншою мірою порушував функцію серця, ніж у щурів Wistar, а показники насосної та діастолічної функції навіть зазнавали покращення. Гостра ізопротеренол-індукована гіпертрофія міокарда прогресивно розвивалася протягом 7 діб впливу адренергічного стимула і зазнавала зворотнього розвитку після його припинення. При наявності хронічної гіпертрофії прогіпертрофічний стимул викликав значну летальність, а зворотній розвиток гіпертрофічної перебудови міокарда не відбувався. Охарактеризували посилення гіпертрофії в усіх експериментальних групах, що супроводжувалось зростанням артеріальної жорсткості та фібротичними змінами в міокарді, також показали зміни експресії таких білків: дистрофіну, Akt, SERCA2,

білка IGF-1 та кофактора HSP60 , а також зміни експресії експресії mRNA IGF-1 та microRNA1.

Вперше показано, що довготривалий розвиток гіпертрофії міокарда при артеріальній гіпертензії у щурів віком 18м характеризувався зростанням морфологічних проявів ремоделювання міокарда та прогресивним погіршенням насосної, систолічної та діастолічної функції серця у порівнянні як з 6-місячними SHR, так і з щурами Wistar віком 18 міс. На підставі одержаних результатів тривалу хронічну гіпертрофію у SHR можна розглядати як модель розвитку серцевої недостатності.

Ключові слова: термінова та стала гіпертрофія серця, ізопротеренол, артеріальна гіпертензія, IGF1, microRNA1, функція серця, щури, старіння.

SUMMARY

Lapikova-Bryhinska T.Y. The role of insulin-like growth factor 1 (IGF1) in the molecular and genetic mechanisms of myocardial hypertrophy.- Manuscript.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (Ph.D.) in Biological Sciences on a specialty 03.00.13. - Human and animal physiology - Bogomolets Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to the study of the role of IGF1 in mechanisms of development of cardiac hypertrophy: urgent one - isoproterenol-induced, and permanent - reproduced in spontaneously hypertensive rats. The function and structure of the heart, as well as changes that occurred at the molecular genetic level, were studied. For the first time, the development and reverse dynamics of emergency hypertrophy in Wistar and SHR rats and associated changes in the expression of target genes and proteins involved in the functioning of the cardiovascular system were characterized. The manifestations and mechanisms of urgent and permanent left ventricular hypertrophy development caused by the influence of adrenergic stimuli and post-load in spontaneous arterial hypertension are investigated. For the first time, the dynamics and microRNA-1-mediated regulation of one of the key regulators of cardiac hypertrophy - IGF1 in the process of acute and chronic development of hypertrophy - were characterized. Impaired maturation and decreased expression of microRNA-1, which developed with age and was more pronounced in SHR, were observed, as a result of which the levels of IGF-1 protein in the myocardium increased regardless of the presence of hypertrophy. Intraventricular measurement of pressure and volume with a microcatheter Millar instruments showed that the development of persistent hypertrophy in SHR was accompanied by a decrease of pumping and systolic function of the heart, but isoproterenol impaired heart function to a lesser extent than in Wistar rats, and even led to pump and diastolic functions

improvement. Acute isoproterenol-induced myocardial hypertrophy progressively developed within 7 days of exposure to the adrenergic stimulus and was reversed after fourteen days. In the presence of chronic hypertrophy, the hypertrophic stimulus caused significant mortality, and the reverse development of hypertrophic myocardial rearrangement did not occur. It was also found that increased levels of hypertrophy in all experimental groups, accompanied by increased arterial stiffness and fibrotic changes in the myocardium, also showed changes in the expression of the following proteins: dystrophin, Akt, SERCA2, IGF-1 protein, and HSP60 cofactor, as well as changes in IGF-1 gene and microRNA1 expression.

It was shown for the first time that the long-term development of myocardial hypertrophy in hypertension in 18-month-old rats was characterized by an increase in morphological manifestations of myocardial remodeling and progressive decline of pumping, systolic, and diastolic heart functions compared to both 6-month-old SHR and Wistar rats. Based on the obtained results, long-term chronic hypertrophy in SHR can be considered as a model of heart failure. Keywords: urgent and permanent cardiac hypertrophy, isoproterenol, arterial hypertension, IGF1, microRNA1, heart function, rats, aging.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГМ- гіпертрофія міокарда

ЛШ- лівий шлуночок серця

IGF-1 – інсуліноподібний фактор росту 1

ІЗО – ізопротеренол

ІМ – інфаркт міокарду

мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота

СН – серцева недостатність

SHR – спонтанно-гіпертензивні щури

EF – фракція викиду

КСО – кінцево-сistolічний об'єм

КСТ – кінцево-сistolічний тиск

ЧСС – частота серцевих скорочень

dP/dtmax - максимальна швидкість скорочення міокарда

EDV - кінцево-діастолічний об'єм

EDP – кінцево-діастолічний тиск

dP/dtmin - максимальна швидкість розслаблення міокарда

τ_w - ізоволіумічна константа розслаблення міокарда за методом τ Weiss

AE – артеріальна жорсткість