

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

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

ЛАПКОВА-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**

Спеціальність 03.00.13 - фізіологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело Лапікова-Бригінської Т.Ю.

Науковий керівник: **Портниченко Алла Георгіївна**
доктор медичних наук.

Київ – 2020

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, ізопротренол-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 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-Bryhinska 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., **Лапікова-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., **Лапікова-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.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ЗМІСТ.....	10
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	13
ВСТУП.....	14
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	19
1.1. Сучасні уявлення про поняття гіпертрофії міокарда та механізми її розвитку.....	20
1.2. Гіпертрофія міокарда, індукована тривалою активацією β -адренорецепторів.....	27
1.3. Інсуліноподібний фактор росту 1. Сигнальний шлях IGF1-PI3K-Akt і регуляція гіпертрофії серця.....	31
1.3.1. Основні властивості інсуліноподібного фактору росту1.....	32
1.3.2. Структура інсуліноподібного фактору росту-1 та його рецептора.....	33
1.3.3. SERCA2a, дистрофін, білки теплового шоку (Hsp) та їх роль у гіпертрофії міокарда.....	36
1.3.4. Akt як ключова кіназа IGF-1-залежного сигнального шляху.....	39
1.4. Дефіцит IGF-1 і серцева недостатність.....	43
1.5. МікроРНК-1 як корегулятор IGF1.....	45
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	48
2.1. Об'єкт досліджень.....	48
2.2. Моделювання гіпертрофії серця шляхом β -адренергічної стимуляції.....	48
2.3. Метод реєстрації та аналізу кардіодинамічних показників <i>in vivo</i>	49
2.4. Дослідження скоротливої функції серця при тимчасовій оклюзії нижньої порожнистої вени.....	50

2.5. Метод фарбування гістологічних препаратів за Ван Гізоном.....	53
2.6. Електронна мікроскопія зразків.....	54
2.7. Визначення експресії білків методом Western Blotting.....	54
2.7.1. Приготування зразків.....	54
2.7.2. Визначення вмісту білку у зразках.....	55
2.7.3. Проведення електрофорезу.....	55
2.7.4. Проведення трансфера.....	55
2.7.5. Обробка антитілами.....	56
2.8. Дослідження експресії гена IGF-1 та мікроРНК1 методом ПЛР-аналізу.....	56
2.8.1. Виділення сумарної мРНК.....	56
2.8.2. Метод зворотної транскрипції.....	57
2.8.3. Полімеразно-ланцюгова реакція у реальному часі.....	57
2.9. Статистичний аналіз експериментальних даних.....	58
РОЗДІЛ 3. МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ТЕРМІНОВОЇ ТА СТАЛОЇ ГІПЕРТРОФІЇ СЕРЦЯ У ЩУРІВ ЛІНІЙ WISTAR І SHR.....	59
3.1. Розвиток гіпертрофії у експериментальних тварин.....	59
3.2. Кардіогемодинаміка під впливом тривалого введення ISO.....	61
3.3. Морфологічні зміни серця щурів при терміновій та сталій гіпертрофії серця.....	72
3.4. Зміни експресії структурних, сигнальних та регуляторних білків у шлуночках серця щурів Wistar та SHR в динаміці ізопротеренол-індукованої гіпертрофії.....	82
3.5. Зміни експресії IGF1mRNA та білка IGF1 і зміни експресії microRNA1 у шлуночках серця щурів Wistar та SHR в динаміці ізопротеренол-індукованої гіпертрофії.....	89

РОЗДІЛ 4. ВІКОВІ ПРОЯВИ І МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ГІПЕРТРОФІЇ МІОКАРДА У ЩУРІВ ЛІНІЇ SHR.....	89
4.1. Розвиток гіпертрофії у експериментальних тварин.....	89
4.2. Кардіогемодинаміка при старінні у щурів WISTAR і SHR.....	89
4.3. Морфологічні зміни серця щурів лінії SHR віком 18м при тривалій хронічній гіпертрофії, індукованій збільшеним постнавантаженням на серце, у порівнянні з щурами лінії Wistar.....	101
4.4. Зміни експресії білка IGF1 та зміни експресії microRNA1 і його мотурації у шлуночках серця SHR віком 18м при тривалій хронічній гіпертрофії, індукованій збільшеним постнавантаженням на серце, у порівнянні з щурами лінії Wistar.....	106
РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	109
Висновки.....	134
Список використаних джерел.....	136

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГМ- гіпертрофія міокарда

IGF-1 – інсуліноподібний фактор росту 1

β -АР – β -адренорецептор

ІЗО – ізопротеренол

ІМ – інфаркт міокарду

ІХС – ішемічна хвороба серця

ЛШЛ – лівий шлуночок

мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота

СН – серцева недостатність

SHR – спонтанно-гіпертензивні щури

ХОК – хвилинний об'єм крові

ФВ – фракція викиду

УО – ударний об'єм

УР – ударна робота

КСО – кінцево-сistolічний об'єм

КСТ – кінцево-сistolічний тиск

ЧСС– частота серцевих скорочень

dP/dt_{\max} - максимальна швидкість скорочення міокарда

КДО - кінцево-діастолічний об'єм

КДТ – кінцево-діастолічний тиск

dP/dt_{\min} - максимальна швидкість розслаблення міокарда

τ_w - ізовольюмічна константа розслаблення міокарда

АЕ – артеріальна жорсткість

ВСТУП

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 [1]. 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. Хоча гіпертрофія у дорослому віці, у кінцевому підсумку, може призвести до захворювань серцево-судинної системи, проте не обов'язково є дезадаптивною. Наразі є прогрес у розумінні структурних та молекулярних характеристик ГМ викликаній різними чинниками, зокрема ендокринними ефекторами і пов'язаних з ними сигнальними шляхами. 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. Останні відомості свідчать, що до цього процесу також можуть бути залучені некодуючі РНК, зокрема, основна міокардіальна мікроРНК-1, яка може регулювати транскрипцію гена IGF-1. Незважаючи на те, що залучення багатьох сигнальних шляхів до розвитку гіпертрофії відоме, динаміка активації тих чи інших молекулярних факторів в процесі розвитку гострої та хронічної 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Упродовж останніх десятиріч значно зросла частка неінфекційних захворювань у структурі смертності та інвалідизації населення як розвинутих, так і країн, що розвиваються [2], найбільшу частку з яких складають серцево-судинні захворювання (ССЗ). Незважаючи на велику кількість експериментальних і клінічних досліджень, захворювання серцево-судинної системи і сьогодні залишаються важливою медико-соціальною проблемою. Загалом, 18 млн. смертей у світі пов'язані з хворобами серцево-судинної системи [3]. Серцева недостатність (СН) є однією з основних причин яка викликає смертність [4] внаслідок таких ССЗ як інфаркт міокарда (ІМ) і успадковані або розвинуті кардіоміопатії тощо. Смертність від ІМ та хронічної серцевої недостатності (ХСН), за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, є надзвичайно високою в усьому світі [5].

У деяких людей спостерігається збільшення розмірів серця (гіпертрофія міокарда, ГМ), що є поганою прогностичною ознакою, оскільки вона часто є передумовою СН. Наразі існує великий інтерес з боку дослідників до вивчення відповідних молекулярних, генетичних механізмів, що індукують

ГМ, його ремоделювання та перехід до СН. Також відомо, що не всі форми гіпертрофії призводять до послаблення серцевої функції (насосної, скоротливої). Наприклад, у відповідь на регулярні фізичні тренування серце збільшується в розмірах, але це також і захищає його від розвитку СН, цей тип гіпертрофії згадується в літературі як фізіологічна гіпертрофія серця або "серце атлета" але відповідні регуляторні механізми недостатньо вивчені.

1.1. Сучасні уявлення про поняття гіпертрофії міокарда та механізми її розвитку.

Відповідно до сучасного визначення, ГМ – це зміни розміру та маси серцевого м'яза, що виникає внаслідок збільшення розміру кардіоміоцитів та зміни інших компонентів серцевого м'яза, таких як позаклітинний матрикс, а також його геометрії, форми, композиції та функції даного органу в результаті перевантаження чи пошкодження [6]. Причини можуть бути фізіологічними – наприклад, під час вагітності, або через надмірну кількість фізичних вправ, які виконує спортсмен - або патологічними - наприклад, внаслідок впливу артеріальної гіпертензії (АГ), захворювання клапанів, стеноз аорти, в цьому випадку гіпертрофований лівий шлуночок (ЛШЛ) серця втрачає еластичність, стінки потовщуються, стають жорсткими, що може перешкоджати здоровому кровотоку [7].

Ремоделювання ЛШЛ частіше виявляється за умови наявності АГ та розглядається як один із пристосувальних механізмів до гемодинамічного перевантаження серця у відповідь на системну гіпертензію [8].

Хоча людське серце містить 2–3 млрд. клітин, на них припадає лише третина від загальної кількості клітин серцевого м'яза. Решта – це клітини різних типів, включаючи гладеньком'язові та ендотеліальні клітини коронарної судинної системи та ендокарду, фібробласти та інші клітини сполучної тканини, тучні клітини та ті, що пов'язані з імунною системою.

Ці різні клітинні групи не функціонують ізольовано один від одного в серці, вони взаємодіють фізично і через різні розчинні паракринні, аутокринні та ендокринні фактори. Також гіпертрофію клітин серцевого м'яза, зазвичай пов'язують з ендотеліальною дисфункцією [9], [10]. Гіпертрофія кардіоміоцитів є провідним механізмом зменшення напруження стінки лівого шлуночка у відповідь на перевантаження тиском. Вона пов'язана зі складною мережею внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, які активують експресію генів, запускають синтез протеїнів, що приводить до зростання кількості саркомерів та розміру кардіоміоцитів.

Процес переходу ГМ до СН є результатом зниженого ангіогенезу, посиленням фіброзу та відкладенням позаклітинного матриксу [9]. Позаклітинний матрикс не тільки забезпечує структурну підтримку, що дозволяє клітинам серця бути взаємопов'язаними, але також є джерелом цитокінів і факторів росту. При різних патологічних станах позаклітинний матрикс, під впливом аутокринних і паракринних сигналів, піддається ремоделюванню його структурних компонентів, які індукують диференціацію фіброblastів серця в гладком'язові актино-експресуючі міофіброblastи, і це в підсумку призводить до секреції великої кількості білків [11].

Зрілі кардіоміоцити традиційно розглядають як кінцево диференційовані клітини, не здатні до поділу. У той же час, парадигма, що здорове серце – це постмітотичний орган, змінена сучасними експериментальними даними, які свідчать, що клітини серцевого м'язу мають здатність до проліферації за умови тяжкої гіпертрофії, після інфаркту міокарда та на кінцевих стадіях СН [12]. Таким чином, можна припустити, що зростання маси міокарда ЛШЛ при його гіпертрофії може бути наслідком гіпертрофії та гіперплазії як кардіоміоцитів, так і інших клітин [12].

У здоровому серці людини є популяція серцевих макрофагів, яка закладається ще під час ембріогенезу і зберігається у зрілому віці. Макрофаги і рекрутовані моноцити також можуть бути залучені до ремоделювання серця. Ця гіпотеза підтримується спостереженням, що про- запальні цитокіни вивільняються під час його пошкодження; однак, точна роль цих запальних клітин у гіпертрофії міокарда все ще не визначена [13], [14]. Оскільки гіпертрофія серця супроводжується погіршенням продукції АТФ, також важливо підкреслити асоціацію мітохондріального компонента з розвитком гіпертрофічного фенотипу серця. Всі ці зміни супроводжуються фіброзом, розтягненням шлуночків і запаленням [15]. Збільшення маси серця тісно пов'язане з його функціональним навантаженням. Макроскопічна картина гіпертрофії серця: збільшене в об'ємі, зростання його маси, якщо в нормі маса серця в середньому становить 250-280 г, то в умовах патології вона може досягати 1 кг, а в деяких випадках і більше. М'язова стінка гіпертрофованого серця різко потовщена. Нормальна товщина стінки ЛШЛ 0.8-1.0 см, при гіпертрофії до 2-3 см. Правий шлуночок в нормі товщиною 0.2-0.4 см, при гіпертрофії потовщується до 1.0-1.5 см.

Найбільш доказовою теорією, яка пояснює механізми переходу гіперфункції серця в його гіпертрофію, є концепція Ф.Меєрсона [Меєрсон Ф.З., Адаптация сердца к большой нагрузке и сердечная недостаточность. М.: Наука. 1975г. 264 с. та ін] [16], згідно з якою посилення функції кардіоміоцитів активує їх генетичний апарат, що проявляється збільшенням інтенсивності синтезу нуклеїнових кислот і білків. Вважають, що одним з важливих сигналів до активації генома є зростання «потенціалу фосфорилювання» (ПФ), що описується відношенням:

$$\text{ПФ} = \frac{\text{АМФ} + \text{АДФ} + \text{Кр} + \text{Фн}}{\text{АТФ}}$$

де АМФ, АДФ, АТФ відповідно концентрація аденозинмоно-, ди-, трифосфату, Кр - креатиніну, Фн - фосфату неорганічного.

Таким чином, розвиток гіпертрофії серця можна описати такою послідовністю процесів: збільшення навантаження на серце (гіперфункція) посилене використання АТФ, що перевищує інтенсивність його ресинтезу → збільшення потенціалу фосфорилування → поява чи збільшення концентрації в клітинах речовин-регуляторів транскрипції → зростання інтенсивності синтезу мРНК і процесів трансляції в рибосомах → посилення біосинтезу структурних функціональних білків і білків-ферментів → збільшення маси міокарда, його гіпертрофія.

Гіпертрофоване серце відрізняється від нормального за рядом обмінних, функціональних і структурних ознак: порушення нервової регуляції гіпертрофованого серця у зв'язку з відставанням росту нервових закінчень від збільшення маси кардіоміоцитів; погіршення «судинного забезпечення» міокарда в результаті відставання росту артеріол і капілярів від збільшення розмірів і маси м'язових клітин; велике збільшення маси клітин міокарда в порівнянні з їх поверхнею, що призводить до зменшення клітинної поверхні на одиницю маси клітини, а через поверхню клітини відбуваються обмінні процеси - поглинання кисню, поживних речовин, виведення продуктів метаболізму, обмін води і електролітів; зниження рівня енергозабезпечення клітин міокарда в результаті відставання зростання маси мітохондрій у порівнянні з масою міофібрил; збільшення співвідношення між легкими і важкими ланцюгами голівок міозину - носіями АТФазної активності, що веде до зниження скоротливої функції серця; збільшення об'єму клітини у порівнянні із ростом об'єму ядра, що веде до порушення синтезу білків і пригнічення процесів пластичного забезпечення кардіоміоцитів. Кардіоміоцити замінюються сполучною тканиною, і, якщо 20–30 % маси серця буде замінено сполучною тканиною, нормальна робота серця неможлива [17] [18] [19].

Виділяють дві форми гіпертрофії міокарда: концентричну та ексцентричну [20]. Патологічний стимул, що ініціює перевантаження тиском, призводить до підвищення систолічного напруження стінки, що в результаті веде до концентричної гіпертрофії (серця з товстими стінками і відносно невеликими порожнинами). На противагу цьому, при перевантаженні об'ємом відбувається підвищення діастолічного напруження стінки, що призводить до ексцентричної гіпертрофії (серця з великими дилатованими порожнинами та відносно тонкими стінками) [7].

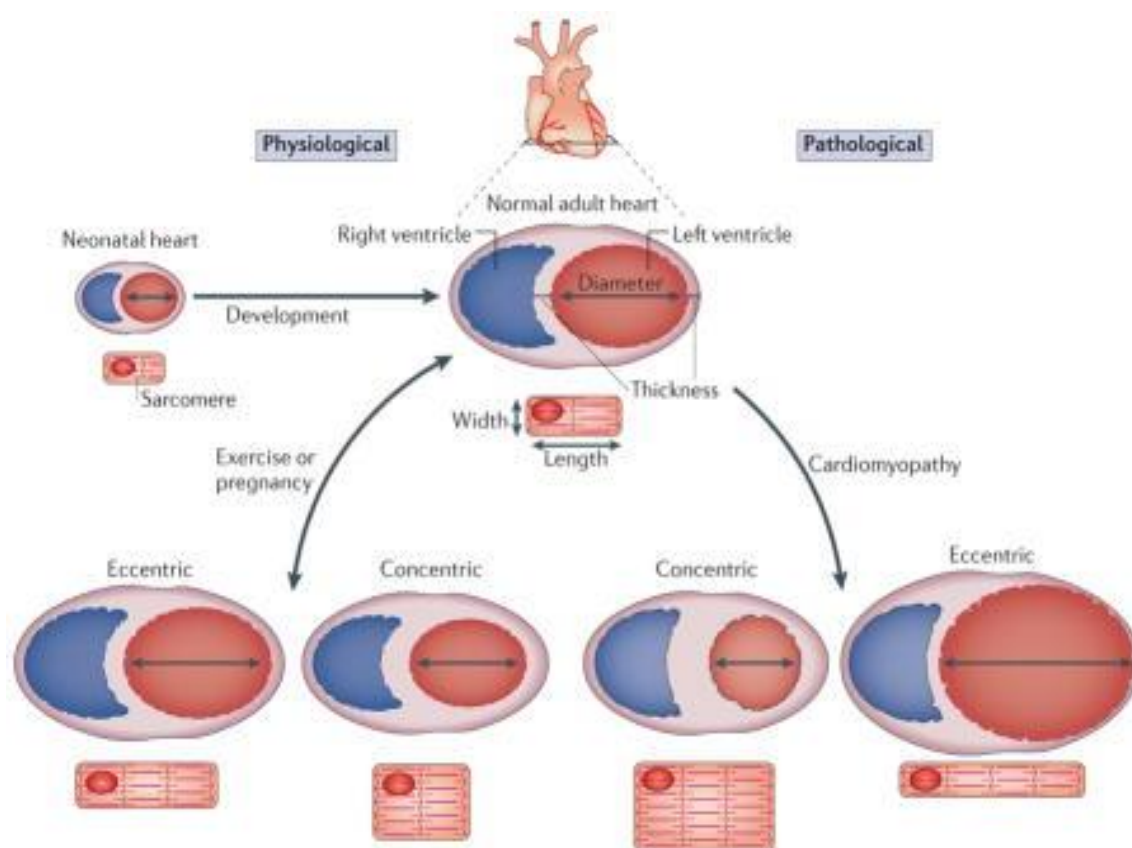


Рис. 1. Геометрія гіпертрофії серця [21].

Навантаження збільшується в таких умовах як хронічний високий кров'яний тиск або фізичні навантаження. Серце здатне протистояти підвищеному навантаженню / напруженню стінок шляхом синтезу скорочувальних білків у кардіоміоцитах. Це призводить до збільшення

розмірів кардіоміоцитів та гіпертрофії серця [22] [23]. Спочатку збільшення розміру серця не впливає на його функціонування, а збільшення серця називається компенсаторною гіпертрофією серця. Однак, якщо хронічне збільшення напруженості стінки зберігається, серцеві камери розширюються, кардіогемодинамічні показники знижуються, і серце зрештою не може нормально виконувати свою насосну функцію (також ці зміни називають декомпенсованою гіпертрофією та СН). Таким чином, гіпертрофія серця є незалежним фактором ризику розвитку аритмії, інфаркту міокарда (ІМ) та раптової смерті [23]. Винятком вважається серце атлета, адже у професійних спортсменів у відповідь на хронічне фізичне навантаження воно збільшується, але це не призводить до СН, проте це питання є недостатньо дослідженим у довготривалих термінах. Крім того, добре відомо, що регулярні тренування у неспортсменів пов'язані зі зниженням ризику виникнення різноманітних ССЗ та смертності [23] [24].

Деякі автори класифікують гіпертрофію серця як фізіологічний або патологічний процес [25]. Термін "фізіологічна гіпертрофія серця" охоплює постнатальний ріст серця, гіпертрофію, викликану вагітністю та збільшення міокарда, викликаного фізичними навантаженнями. На відміну від цього, термін "патологічна гіпертрофія" був використаний для опису ремоделювання серця у відповідь на хронічний тиск або перевантаження об'ємом за умов різних патологічних станів, наприклад: артеріальна гіпертензія, клапанна СН, ІМ або ішемія, а також спадковані генетичні мутації або діабет, цей вид гіпертрофії є незворотнім.

За будовою серце складається з кардіоміоцитів (спеціалізовані м'язові клітини, що складаються з пучків міофібрил, які містять основні скорочувальні одиниці серця, саркомери), інших клітин (фібробласти, ендотеліальні клітини, тучні клітини, клітини гладких м'язів судин) та позаклітинного матриксу [ZakR (1984) RavenPress, NewYork, pp 1–24, 131–

185, 381–420]. У ссавців більшість кардіоміоцитів втрачають здатність до розмноження вже при народженні або незабаром після народження, і їх зростання відбувається в основному за рахунок збільшення об'єму кардіоміоцитів [26].

Дослідження на тваринах показали, що маса серця може збільшуватися до аналогічного ступеня у відповідь і на патологічні, і на фізіологічні подразники, наприклад на 40% у відповідь на перев'язку аорти або довготривале плавання [27], але їх механізми можуть мати значну відмінність. Відомо, що патологічна і фізіологічна гіпертрофія серця пов'язана з виразними функціональними, гістологічними та молекулярними особливостями [28]. Незворотню гіпертрофію, як правило, пов'язують з втратою міоцитів та їх заміною на фіброцити, порушенням ангиогенезом, серцевою дисфункцією, підвищеним ризиком розвитку СН та раптовою смертю [29] [30] [31]. Навпаки, фізіологічний ріст серця пов'язаний з нормальною серцевою структурою, підтримується або навіть покращується функція серця і, як правило, ця гіпертрофія є оборотною, наприклад, розмір серця повертається до нормального, якщо припинити фізичне навантаження або після вагітності [32]. Ці відмінні фенотипи також пов'язують з різними молекулярними механізмами. Так звану патологічну гіпертрофію асоціюють з підвищеною регуляцією генів плоду (фетальна програма), а також передсердними та β -натрійуретичними пептидами (ANP, BNP) та важкого ланцюга β -міозину (β -МНС), а також редукцією генів, важливих для підтримки скоротливої функції, таких як α -МНС і саркоплазматичних кальцієвих pomp (SERCA2a) [33]. На відміну від цього, ці зміни експресії генів не характерні для гіпертрофії, викликаній фізичними навантаженнями [27].

Розуміння клітинних і молекулярних механізмів, що відповідають за індукцію патологічної та фізіологічної гіпертрофії серця, були отримані

шляхом вивчення генетично модифікованих мишей. Оскільки кардіоміоцити складають 70-80% маси серця, вчені зосередили свій погляд на вивченні ролі сигнальних шляхів у кардіоміоцитах. Проте, паралельно із ростом серця для підтримки серцевої функції повинні відбуватися численні процеси, такі як ріст судин (ангіогенез), зміна роботи мітохондрій та регуляція позаклітинного матриксу. У фізіологічних умовах або при виникненні фізіологічної гіпертрофії фібрилярна колагенова мережа забезпечує структурну цілісність кардіоміоцитів, що дозволяє серцю ефективно виконувати свою насосну функцію [GunasingheSK, (2004) HeartFailure. Saunders, Philadelphia, pp 57–70]. Патологічна гіпертрофія серця, як правило, пов'язана з загибеллю клітин, які замінюються накопиченнями колагену (розвивається фіброз, що значно погіршує здатність серця до скорочення) та неадекватний ангіогенез. Фіброз разом зі зниження густини капілярів призводять до ішемії міокарда і, ймовірно, сприяє переходу від патологічної гіпертрофії до недостатності [31] [30].

1.2. Гіпертрофія міокарда, індукована тривалою активацією β -адренорецепторів.

Гіпертрофія серця також викликається адренергічною активацією. Механізми стимулювання серцевого росту під впливом надмірної адренергічної активації, а також розуміння, яким чином структурні зміни гіпертрофованого міокарду можуть впливати на його функцію, було досліджено в роботах з використанням тваринних моделей хронічного застосування агоніста β -адренорецепторів (β -АР) [34] [35]. Встановлено, що тривала адренергічна активація посилює синтез білків міокарду. Це опосередковано стимуляцією ростових факторів у міокарді, збільшенням експресії ядерних протоонкогенів, індукцією оксидативного стресу, активацією мітоген-активованих протеїнкіназ та фосфатидилінозитол-3-кінази. Активація β -АР протягом тривалого часу погіршує серцеву

автономну регуляцію, що підтверджується ослабленням парасимпатично-опосередкованих серцево-судинних рефлексів, а також порушенням зберігання катехоламінів у міокарді. Катехоламін-індукована серцева гіпертрофія пов'язана зі зниженням скоротливої функції у відповідь на дію адренергічних агоністів. Цей ефект пов'язують зі зниженням кількості β -АР, роз'єднанням β -АР та аденілатциклази, а також модифікаціями цАМФ-опосередкованих сигнальних шляхів. Прогресія серцевої гіпертрофії до СН відбувається під впливом кальцієвого навантаження [36], некротичного пошкодження міокарду, підвищеної жорсткості міокарду за рахунок інтерстиціального фіброзу [37] [38].

Одними з перших робіт, що вказували на стимуляцію ГМ під впливом *in vivo* ін'єкцій ізопротеренолу (ІЗО), який є агоністом β -АР, були пов'язані з розвитком експериментальної моделі некоронарогенного некрозу міокарду [ChappelCI, etal (1951) ArchIntPharmacodyn 72:123–128]. У цих дослідженнях було показано, що підшкірні ін'єкції ізопротеренолу у великих дозах (20-100 мг/кг) протягом 1-3 днів у щурів [RonaG, etal (1959) JGerontol 14:169–173; RonaG, ChappelCI, BalazsTetal (1959) ArchPathol 67:443–455 ; RonaG, (1963) AmHeartJ 66:389–395; RonaG (1985) Catecholamine cardiotoxicity. JMolCellCardiol], хом'яка [HandforthCP (1962) ArchPathol 73:83–87] та мавп [MaruffoCA (1967) AmJPathol 50:27–34] і черепахи [OstadalB, (1968) AmHeartJ 76:645–649 17:291–306] індукували некроз, подібний до інфаркту міокарда у людей. Одноразове застосування ізопротеренолу зумовлює значну тахікардію, пов'язану зі зменшенням кров'яного тиску в аорті, що вказує на те, що відносна ішемія міокарду (внаслідок невідповідності між кисневими потребами міокарду і зниженим коронарним кровотоком) викликає індуковане ізопротеренолом пошкодження міокарду. Це пошкодження призводило до гіпертрофії, доказом чого слугувало збільшення маси ЛШЛ і потовщення його волокон,

а також збільшення об'єму саркоплазми у кардіоміоцитах. Ці зміни супроводжувалися фокальним накопиченням колагену в міокарді, що свідчило про формування постнекротичного рубця. ГМ у цій моделі розглядається як вторинний репаративний феномен, метою якого є компенсація ослабленої систолічної функції інфарктних сердець [CollinsP, etal (1975) *CardiovascRes* 9:797–806 [39].

Також велика кількість досліджень показала, що серцева гіпертрофія у ссавців може індукуватися введенням ІЗО у дозах на 1-2 порядки нижче, ніж у випадку індукування гострого некротичного пошкодження міокарду. Зокрема, було показано, що повторні підшкірні ін'єкції ІЗО щурам у денних дозах 0,02-3,0 мг/кг протягом 1-4 тижнів індукували збільшення маси серця на 30-70% [40]. Аналогічно, тривала активація β -АР стимулює розвиток гіпертрофії серця у мишей [RobbinsRJ, SwainJL (1992) *JPhysiol* 262:H590–59773. ; HohimerAR, (2005) *CanJPhysiolPharmacol* 83:191–197], морських свинок [MaiselAS, etal (1989) *Circulation* 80:669–675], кроликів [GillisAM, etal (1996) *JCardiovascPharmacol* 27:916–926; KimN, (2006) *BiochimBiophysActa* 1763:1067–1075]. У ненаркотизованих собак з імплантованими підшкірно осмотичними мініпомпами хронічне застосування субпресорних концентрацій норадреналіну (природного β -АР агоністу) викликало значне збільшення маси ЛШЛ [KingBD, etal (1987) *Hypertension* 9:582–590; PatelMB, etal (1991) *Circulation* 84:2091–2100; StewartJM, etal (1992) *AmJPhysiol* 262:H331–339].

Розвиток β -АР-опосередкованої гіпертрофії серця пов'язують з перемиканням на ембріональний фенотип міокарду, про що свідчить підвищення експресії генів, які експресуються у міокарді лише під час ембріонального розвитку, наприклад гену передсердного натрійуретичного пептиду, скелетного α -актину, важких ланцюгів β -міозину [SaadaneN, (1999) *BrJPharmacol* 127:1165–1176 ; SaadaneN, (2000) *AmJPhysiol*

278:H796–805; BishopricNH, KedesL (1991) *ProcNatlAcadSciUSA* 88:2132–2136; BogoyevitchMA, etal (1996) *BiochemJ* 314:115–121]. Індуковані ІЗО ефекти збільшення маси ЛШЛ та підвищення синтезу білків у серці, а також підвищення експресії «ембріональних» генів відмінялися під дією $\beta 1$ -, але не $\beta 2$ -АР блокаторів [SchaferM, etal (2000) *AmJPhysiol* 279:C495–503].

Важливо, що ступінь та терміни розвитку серцевої гіпертрофії, індукованої низькими концентраціями ІЗО, не обов'язково відповідає направленості втрати кардіоміоцитів [41]. Більш того, стимуляція серцевого росту, що підтверджується збільшеним синтезом білків, клітинним об'ємом та площею поверхні кардіоміоцитів, спостерігалася внаслідок тривалого застосування β -АР агоністів [MoriscoC, etal (2001) *JMolCellCardiol* 33:561–573; TomitaH, etal (2003) *CircRes* 93:12–22; SchaferM, etal (2000) *AmJPhysiol* 279:C495–503; SchluterKD, (1995) *AmJPhysiol* 269:C1311–1316].

Вважається, що хронічна β -АР активація стимулює серцеву гіпертрофію через локальну стимуляцію міокардіальних факторів росту, таких як ангіотензин (АТ) II і трансформуючий фактор росту $\beta 1$ (TGF-beta1). Ще одним з таких β -АР-опосередкованих факторів у міокарді є інсуліноподібний фактор росту-1 (IGF-1), було встановлено значне збільшення кількості мРНК та білку IGF-1 у міокарді після хронічного застосування β -АР агоніста у щурів, причому цей ефект асоціювався зі збільшеним показником відношення маси серця до маси тіла і збільшеними розмірами міоцитів [SuzukiJ, et al (1999) *JCardiovascPharmacol* 34:635–644; MiuraS, etal (2003) *JCardiovascPharmacol* 42:174–181; SunXW, (1998) *CardiovascRes* 37:202–209]. Посилення утворення IGF-1 було опосередковано через β -АР агоніст-індуковану активацію матриксних металопротеїназ міокарду, які дисоціюють IGF-1 від IGF-1- зв'язувального білка [MiuraS, etal (2003) *JCardiovascPharmacol* 42:174–181]. Важливо, що зменшення мРНК і білку IGF-1 асоціювалося з регресією серцевої

гіпертрофії після паралельного застосування ІЗО з AT1 рецепторним антагоністом [SuzukiJ, etal (1999) JCardiovascPharmacol 34:635–644] чи з інгібітором матриксної металопротеїнази [42].

Незважаючи на одержані відомості, залишаються недостатньо молекулярні механізми розвитку термінової та сталої гіпертрофії, особливості відповіді на адренергічні навантаження в гіпертрофованому міокарді тощо, що є важливим аспектом для клінічної та спортивної медицини.

1.3. Інсуліноподібний фактор росту 1. Сигнальний шлях IGF1-PI3K-Akt і регуляція гіпертрофії серця. Показано, що інсуліноподібний фактор росту-1 (IGF1) та пов'язані з ним сигнальні шляхи є важливим ланками, залученими до розвитку гіпертрофії.

Активация рецептора IGF-1 призводить до стимуляції декількох каскадів фосфорилювання, які регулюють широкий спектр біологічних ефектів [43]. Є два основних шляхи передачі сигналів IGF-1 [44] [45] [46] [47]. MAP-кіназний включає послідовну активацію таких білків як Ras, Raf-1, MEK і ERK, активація цього шляху пов'язана з ростом і проліферацією клітин. PI3-кіназний шлях включає активацію фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3-кінази) і Akt, і цей шлях пов'язаний з метаболізмом клітин, ростом і антиапоптичною дією [48]. Підвищену активність фосфатидилінозитол-3-кінази було виявлено у культурі кардіоміоцитів щурів, що знаходились під дією β -АР агоніста [49]. Більш того, було встановлено, що інгібітори фосфатидилінозитол-3-кінази послаблюють β -АР-опосередковану стимуляцію синтезу білків міокарду у цих клітинах [49]. Важливо, що ІЗО-індуковане збільшення маси серця, порушення скоротливості, фіброз міокарду, індукція експресії фетальних генів значним чином послаблювалися у мишей з дефіцитом фосфатидилінозитол-3-кінази γ [50].

IGF-1 діє через рецептор IGF-1R, тирозинкіназу, яка активує PI3-K. Зв'язування IGF-1 зі своїм рецептором призводить до аутофосфорилування залишків тирозину всередині внутрішньоклітинного домену і рекрутингу білків, що містять домени SH2, таких як регуляторна субодиниця p85 класу IA PI3K. Дослідження на генетично модифікованих мишах показали, що IGF-1R є важливим регулятором фізіологічної серцевої гіпертрофії [51][52]. Трансгенні миші з посиленням сигнального шляху IGF1-PI3-K (p110альфа) розвивають ГМ, але при цьому тривалість життя була нормальною, а функція серця – нормальною або посиленою [51] [52]. На противагу цьому, миші зі зниженням активності шляху IGF1-PI3-K (p110альфа) мали істотно менші серця [53] [54] [55] [56]. Ці дані вказують на те, що IGF1-PI3-K (p110альфа) шлях є важливим для фізіологічного росту серця. Для визначення ролі цього шляху в індукуванні фізіологічної ГМ, викликаній фізичними тренуваннями, було проведено дослідження, в яких контрольні (нетрансгенні тварини) та миші зі зниженою активністю PI3-K тренувалися плаванням протягом 4 тижнів. Миші зі зниженою активністю PI3-K проявили порушену гіпертрофічну відповідь на тренування плаванням, але не на перевантаження тиском, що може вказувати на важливу роль даного шляху у регуляції фізіологічної ГМ, індукованої фізичним тренуванням [51].

У мишей дикого типу / Ntg перевантаження тиском, індуковане лігацією аорти, призводило до патологічної гіпертрофії серця, з інтерстиціальним фіброзом, реактивацією програми фетальних генів і зниженням експресії мРНК [27] [57] [58]. Трансгенна гіперекспресія IGF-1R або експресія саPI3K (p110α) знизилася рівень ГМ та ступінь інтерстиціального фіброзу в цих моделях [52] [36]. Трансгенні миші саPI3K також характеризувались посиленою систолічною функцією порівняно з мишами Ntg [25], демонструючи, що підвищення активності PI3K (p110α) є протективним.

Було показано, що активація PI3-K-Akt шляху сприяє виживанню кардіоміоцитів як *in vitro*, так і *in vivo*, і захищає клітини від реперфузійного пошкодження [59] [60].

1.3.1. Основні властивості інсуліноподібного фактору росту-1.

IGF-1 в 1957 році був вперше ідентифікований вченими Salmon та Daughaday, які позначали його як “сульфацил фактор”, але 1972 році був замінений терміном соматомедин. Пізніше, у 1976 році, Rinderknecht і Humbel [Salmon WD, J LabClinMed 1957;49:825–36.; Daughaday WH, Nature 1972; 235:107.] виділили дві активні речовини із сироватки крові людини, які внаслідок їх структурної подібності з проінсуліном був перейменований на "інсуліноподібний фактор росту 1 і 2" (IGF-1 і IGF- 2) [61]. Родина IGF факторів росту складається з трьох лігандів, інсулін, IGF-1, IGF-2. У той час як інсулін володіє переважно метаболічною дією, IGF-1 і IGF-2 наділені також мітогенними властивостями, регулюючи клітинну проліферацію [62].

IGF-1 є пептидним гормоном, який вивільняється печінкою у відповідь на рівень соматотропного гормону, структурно споріднений до інсуліну, має плейотропний вплив на ріст і метаболізм клітин, залучений до регуляції розміру тіла та органів під час постнатального розвитку, але також може продукуватися серцем [63]. Показано, утворення серцевого IGF-1, але не ендотеліну 1 (ET-1) або АнгII було вищим у професійних атлетів, ніж у не спортсменів [64], і рівень IGF-1 у сироватці підвищувався у відповідь на тривале фізичне тренування [65] і вправи, що вимагають концентричних або ексцентричних скорочень скелетних м'язів [ZebrowskaA, SportsMed 34(2):116–122].

1.3.2. Структура інсуліноподібного фактору росту-1 та його рецептора.

IGF-1 є складається з 70 амінокислот з молекулярною масою 7649 Да [66]. Як і рецептор до інсуліну, IGF-1R має А і В субодиниці, з'єднані дисульфідними зв'язками. Структурна подібність з інсуліном пояснює здатність IGF-1 зв'язуватися також з рецептором інсуліну (IR).

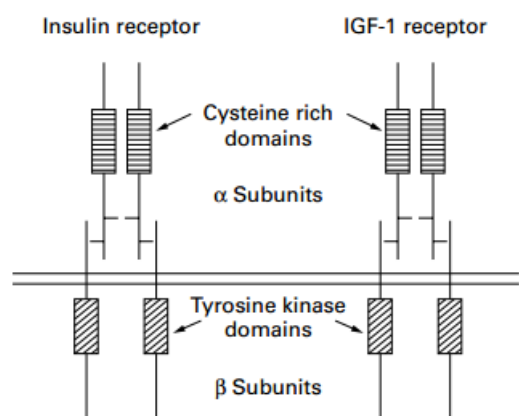


Figure 3 Resemblance between the insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptors.

Рис.1 Структурна схожість між інсуліновим рецептором та рецептором до IGF-1 [1].

IGF-1 локально секретується і діє аутокринним, паракринним та ендокринним чином, стимулюючи синтез білка [Merimee T, Vol. 4. London-TelAviv: FreundPublishingHouseLtd, 1996.] Інші дослідження показують, що IGF-1 відіграє важливу роль в нормальному рості серця [D'Ercole AJ, DevBiol 1980;75:315–28], у багатьох патологічних процесах при серцево-судинних захворюваннях [MicheleArcopinto, Metabolic&ImmuneDisorders - DrugTargetsV13 , Issue 1, 2013], регуляції клітинної проліферації шляхом зв'язування з його рецептором IGF-1R, який присутній на багатьох типах клітин, в тому числі кардіоміоцитах [Bondy CA, MolEndocrinol 1990;4: 1386–98.], диференціюванні, виживанні, і обміні речовин, та виробляється в багатьох тканинах, включаючи серце [Rosenfeld RG, NY: HumanaPress, 1999.]. Білок IGF-1 присутній у 28% шлуночкових кардіоміоцитів щура. Проте, було показано значне підвищення кількості мРНК та білку IGF-1 у міокарді після хронічного

застосування β -АР агоніста у щурів, причому цей ефект асоціювався зі збільшеним показником відношення маси серця до маси тіла і збільшеними розмірами міоцитів. Посилення утворення IGF-1 було опосередковано через β -АР агоніст-індуковану активацію матриксних металопротеїназ міокарду, які дисоціюють IGF-1 від IGF-1-зв'язуючого білка. Також важливим є те, що зменшення мРНК і білку IGF-1 асоціювалося із регресією серцевої гіпертрофії після паралельного застосування ІЗО з АТ1 рецепторним антагоністом чи з інгібітором матриксної металопротеїнази.

На поверхні кардіоміоцитів експресуються рецептори до гормонів росту і IGF-1. Показано, що щільність рецепторів до IGF-1 особливо висока у внутрішніх шарах ЛШЛ, де особливо велике навантаження на серцеву стінку [67] і поступово зменшується в напрямку до епікарда.

IR є гетеротетрамерним рецептором, що складається з двох альфа- і двох бета-субодиниць. Ці субодиниці зв'язані дисульфідно в β - α - α - β конфігурації. α -субодиниці лежать позаклітинно і є ліганд-зв'язуючими субодиницями рецептора, у той час як β -субодиниці містять трансмембранний домен і внутрішньоклітинний домен [68].

Рецептор IGF-1 (IGF-1R) зібраний в таку ж β - α - α - β структуру, як і IR [Seino S, Seino M, Nishi S, et al. Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:114–18.]. При порівнянні IGF-1R з IR, кіназні домени β -субодиниці демонструють більше 80% гомології. Точкою найбільшої розбіжності між інсуліновим рецептором і IGF-1R є позаклітинна α -субодиниця, яка керує ліганд-зв'язуючою специфічністю рецептора таким чином, що кожен рецептор зв'язується тільки з власним лігандом у фізіологічних концентраціях [LeRoith D, Endocr Rev 1995;16:143–63.]. В літературі описано також існування гібридних IR/IGF-1 рецепторів, які підтримують

трансаутофосфорилювальну активність при зв'язуванні ліганду. IR / IGF-1R гібриди присутні в багатьох типах тканин ссавців, у тому числі серця. Хоча IGF-1, як вважають, зв'язуються з гібридними рецепторами з більшою спорідненістю в порівнянні з інсуліном. Інсулін і IGF-1 в кінцевому рахунку мають здатність активувати гібридну сигналізацію рецептора. Також IGF-1 здатний регулювати чутливість до інсуліну в тканинах-мішенях [69]. Дійсно, IGF-1 і IGF-1R підтримують чутливість до інсуліну в м'язах [70]. Тому слід враховувати його роль у гомеостазі глюкози. IGF-1 і інсулін мають різні рецептори, різний розподіл яких дозволяє бачити їх чіткий, але перехресний вплив на метаболізм і виживання [71]. IGF-1 бере участь у білковому, жировому та вуглеводному обміні, а також у проліферації та диференціації переважно через активацію IGF-1R і послідовне фосфорилування залишків тирозину на адапторних білках insulin receptor substrates (IRS-1 і IRS-2) [72]. Це забезпечує сайти зв'язування для p85-субодиниці PI3K, яка потім активується. IRS-1 і PI3K також мають важливе значення для сигналізації та дії інсуліну, таким чином, порушення регуляції рівня IGF-1 може відігравати певну роль у порушеннях метаболізму вуглеводів. Слід зазначити, що специфічний поліморфізм, що включає тандемний повтор у промоторній послідовності гена IGF-1, пов'язаний з підвищеним ризиком розвитку діабету 1 типу [73]. Дослідження показали, що IGF-1 також бере участь у патогенезі цукрового діабету 2 типу. Зменшення IGF-1R в мишачих клітинах скелетних м'язів індукувало прогресування цієї хвороби через певний час [74].

Загалом, ці дані свідчать про те, що порушення інсулінової та / або IGF-1 сигналізації може призвести до зміни метаболічних ефектів інсуліну, таким чином сприяючи резистентності до інсуліну і розвитку цукрового діабету. Таким чином, жорсткий контроль, який здійснюється ендегенними

молекулами, позитивно або негативно залученими до модуляції сигнальних компонентів інсуліну, є вкрай необхідним.

Серед декількох молекул і факторів, що контролюють експресію та / або активність компонентів сигнального каскаду інсуліну або IGF-1, мікроРНК (miR) були ідентифіковані як потужні модулятори. Показано, що miR-1 регулює експресію як IGF-1, так і IGF-1R в серцевих і скелетних м'язах [75]; крім того, автори продемонстрували, що рівні експресії miR-1 знижуються і обернено корелюють з експресією IGF-1 в моделі гіпертрофії серця у щурів.

1.3.3. SERCA2a, дистрофін, білки теплового шоку (Hsp) та їх роль у гіпертрофії міокарда

Показано, що розвиток ремоделювання міокарда і СН супроводжується порушенням кальцієвого гомеостазу кардіоміоцитів з редукцією експресії і активності SERCA2a (розшифрувати) – основного кальцієвого насоса саркоплазматичного ретикулуму. Однак дослідження на мишах з вилученням гену SERCA2a виявило відсутність прямого зв'язку між функцією SERCA2a і розвитком СН [76] [77], що вказує на наявність потужних компенсаторних механізмів. Дослідження останнього десятиріччя показали існування кількох ізоформ SERCA у серці людини, експресія яких різноспрямовано змінюється при СН [78]. Експресія ізоформи SERCA3f зростає при СН різного генезу [79]. В той же час, надекспресія білка SERCA3f викликає стрес ендоплазматичного ретикулуму і індукує білок теплового шоку (шаперон) GRP78, що було показано на клітинних моделях і у хворих з СН [80]. Стрес ендоплазматичного ретикулуму зараз розглядається як один з механізмів патогенезу СН [81] [82] [83]. Дослідження цих механізмів дозволить висвітлити порушення синтезу структурно-регуляторних білків міокарда та їх фолдингу як можливих ланок прогресування СН [84]. Потребує дослідження роль ізоформ SERCA, GRP78 та інших шаперонів у розвитку

патологічного ремоделювання серця і судин, а також як можливої мішені для генно-терапевтичних методів. Серед можливих чинників розвитку ремоделювання міокарда привертає до себе увагу дистрофін – високомолекулярний білок цитоскелету кардіоміоцитів, який в комплексі з глікопротеїнами сарколеми забезпечує стабільність мембрани кардіоміоцитів при скороченні та їх виживання у постішемичному періоді [85] [86]. У мишей, дефіцитних за геном дистрофіну, розвивається дилатаційна кардіоміопатія [87], нестача глікопротеїнів комплексу, пов'язаного з дистрофіном, призводить до таких же, але менш важких наслідків у людини та тварин [88] [89] [90].

Розвиток гіпертрофії ЛШЛ у мишей і щурів з експериментальною констрикцією аорти [91] [92], а також тривалий вплив ендотеліну-1 на кардіоміоцити в культурі [93] супроводжувалися редукцією експресії дистрофіну в клітинах. Дистрофін опосередковує також механізми розвитку недостатності правого шлуночка у щурів, викликаной монокроталіном [88]. Нестача дистрофіну внаслідок мутації його гена у пацієнтів з міодистрофією призводить до розвитку дилатаційної кардіоміопатії та СН [94]. У пацієнтів послідовно розвивається діастолічна дисфункція, ексцентрична гіпертрофія, пізніше – систолічна дисфункція та дилатація камер серця. Дисоціація між ступенем ураження скелетних м'язів і міокарда вказує на особливу роль дистрофіну у серці [95]. Часткова недостатність дистрофіну у пацієнтів з міодистрофією Беккера супроводжується менш важкими структурними і функціональними порушеннями в серці, ніж при повній нестачі дистрофіну у хворих на міодистрофію Дюшенна (рецесивні гомозиготи) [95].

Незважаючи на тривалі клінічні дослідження цієї патології, молекулярні механізми патологічних змін і ролі дистрофіну в кардіопротекції почали визначати тільки останнім часом.

Зростає інтерес до ролі білків теплового шоку (Hsp) в біології серцевого м'яза [D.S. Latchman, Cardiovasc. Res. 51 (4) (2001) 637–646.]. Серед них для розвитку гіпертрофії важливим може бути кофактор IGF-1 Hsp 60, який має важливі функції в серці [S. Lau, Circulation 96 (7) (1997) 2287–2294.; S.R. Kirchhoff, Circulation 105 (24) (2002) 2899–2904.; A.E. Schafner, Basic Res. Cardiol. 97 (3) (2002) 258–261.]. Hsp60 існує як в мітохондріях, так і в цитоплазмі і може утворювати мітохондріальні шаперонні комплекси з Hsp10, які, як вважають, відіграють роль у підтримці нормальної мітохондріальної функції [S. Lau, Circulation 96 (7) (1997) 2287–2294.]. Додаткові мітохондріальні ефекти Hsp60 включають регуляцію білків родини Bcl-2. Експресія Hsp60 у міокарді збільшується під час ішемічно-реперфузійного пошкодження, що ймовірно, представляє собою ланку механізмів захисту міокарда [A.E. Schafner, Basic Res. Cardiol. 97 (3) (2002) 258–261.]. Крім того, надмірна експресія Hsp60 інгібує апоптоз кардіоміоцитів при ішемічних пошкодженнях [K.M. Lin, Circulation 103 (13) (2001) 1787–1792.]. Продемонстровано захисну роль Hsp60 в тканинах, відмінних від серцевого м'яза [K. Izaki, Brain Res. Mol. Brain Res. 88 (1–2) (2001) 14–25.]. Також показано, що білки теплового шоку можуть модулювати IGF-1-опосередковану сигналізацію [Y.X. Shan, Mol. Cell Cardiol. 35 (9) (2003) 1135–1143.]. Надмірна експресія Hsp60 в кардіоміоцитах призводить до підвищення регуляції кількості IGF-1 рецепторів і збільшення їх фосфорилування. Навпаки, пригнічення Hsp60 антисенсовими олігонуклеотидами веде до зниження активації рецепторів IGF-1 і їх сигналізації. Hsp60 модулює убіквітінування рецептора IGF-1. Надмірна ж експресія Hsp60 навпаки пригнічує цей процес і тим самим збільшує вміст рецепторів. Ці дані вказують, що дія Hsp60 може посилювати IGF-1 сигналізацію [Y.X. Shan, Mol. Cell Cardiol. 35 (9) (2003) 1135–1143.].

1.3.4. Akt як ключова кіназа IGF-1-залежного сигнального шляху.

Akt – серин-треонінова кіназа (відома також як протеїнкіназа B) – відома мішень PI3-K(26). У літературі є велика кількість повідомлень, що доводять кардіопротекторну роль активації Akt у міокарді [96] [97] [98] [99] [100] [101], збереженні кардіоміоцитів і підтримці функцій серця. Декілька експериментальних робіт показали необхідність дії Akt сигналізації на кардіоміоцити, фібробласти, клітини гладкої мускулатури судин та для виживання ендотеліальних клітин [102]. IGF-I активує PI3K, що веде до активації Akt та множинних ефекторів цього молекулярного механізму. Активація Akt збільшує рівень апоптотичних кардіоміоцитів у відповідь на ішемічно-реперфузійне пошкодження [103], перевантаження тиском [104] та окислювальний стрес [105]. Зниження активності Akt також пов'язане з посиленням апоптозу при СН [106].

Однак вірусний міокардит відрізняється від загальної кардіопротекторної ролі Akt, оскільки гальмування його активності, схоже, покращує захисні ефекти [107] [108] [109].

Також Akt є вузловою кіназою у сприянні клітинного метаболізму та реконструкції і давно визнана головним учасником гіпертрофічної сигналізації [110] [111]. Цікаво, що експресія Akt зменшується під час вагітності і нормалізується в післяпологовий період, що говорить про особливості регуляції Akt при компенсаторній м'язовій гіпертрофії, однак її «антигіпертрофічну роль» за цих умов [112] не можна вважати доведеною. Розвиток “фізіологічної гіпертрофії серця”, опосередкований активацією Akt, що пов'язана з проведенням сигналу через PI3K класу I (A). Рівні фосфорилування Akt демонструють тимчасові зміни у щурів, що здійснювали фізичні вправи, зменшуючись на 1-му тижні. Активність Akt

індукується у кардіоміоцитах новонароджених щурів TNF- α , що призводить до посилення синтезу білка та клітинної гіпертрофії [113].

Гормони щитовидної залози регулюють фізіологічну гіпертрофію серця, діючи як транскрипційно активні білки, одночасно беручи участь у процесах сигналізації [114]. Вони активують PI3K/Akt у кардіоміоцитах, що, в свою чергу, індукує mTOR шлях і трансляцію білка [115]. Активація або інактивація шляху Akt/mTOR, схоже, пов'язана з розвитком фізіологічної адаптації проти патологічної серцевої гіпертрофії. Миші, яких тренували на біговій доріжці протягом 6 тижнів, та миші, в яких було здійснено поперечне звуження аорти, розвивали фізіологічну ГМ проти патологічної ГМ [116]. Таким чином, молекулярний механізм PI3K/Akt, здається, пов'язаним з фізіологічною ГМ, тоді як сигналізація MAPK у співпраці зі шляхами РКС та кальциневрин/NFAT бере участь у розвитку патологічної гіпертрофії, наприклад, спричиненої ангіотензином II [25]. Akt також контролює розмір кардіоміоцитів шляхом інактивації факторів транскрипції FOXO, які сприяють експресії атрофічних генів [117]. Важливо, що дерегуляція ланки Akt/FOXO може бути пов'язана з розвитком патологічної гіпертрофії [118]. Ці результати підтверджують думку про те, що гіпертрофія серця пов'язана з рівнем активності кінази в цитоплазмі [119]. Також було продемонстровано, що локалізація Akt має вирішальне значення для регулювання функції [120]. Надмірна експресія ядерно-орієнтованої Akt посилює кардіозахист та антагонізує серцеву гіпертрофію [121].

Також Akt є важливою кіназою при старінні. Послаблення сигналювання про виживання та посилення клітинного старіння призводить до погіршення функції серця в літньому віці. Зв'язок між старінням та зменшенням сигналів IGF-I в решті-решт призводить до розгляду сигналізації, опосередкованої Akt, як тригера вікових захворювань серця

[122]. Втрата активності Akt корелює зі зменшеною проліферацією та розвитком старечого фенотипу у серцевих фібробластах [123]. Корелятами фенотипу старіння є знижена чутливість до інсуліну та серцева дисфункція, які також пов'язані зі зниженням рівня експресії Akt [124] [125].

Окисний стрес значною мірою сприяє віковим захворюванням через накопичення активних форм кисню (АФК). Зменшення надходження сигналів виживання клітини через Akt призводить до збільшення чутливості до АФК-індукованого апоптозу в серці разом з багатьма іншими типами клітин [126] [127]. Зниження сигналів IGF-I зменшує поділ CSC (Spoke associated Complex), що призводить до зниження функціонально компетентних резервів CSC та потенціалу регенерації нових міоцитів. Інгібіція IGF-I і експресії Akt призводить до збільшення регуляції плейотрофіну (PTN) - це секретований білок, який належить до нового сімейства висококонсервативних гепарин-зв'язуючих факторів росту, під час інфаркту міокарда, а також до дилатаційної кардіоміопатії через посилення апоптозу [128].

Показано, що Akt-опосередкована сигналізація діє на різні посередники старіння. Специфічні клітинні білки, що індукують клітинне старіння, включають p16, p21, p27 і p53. Накопичення p16 у мишей у віці є репрезентативним старінням клітин. Однак у трансгенних мишей IGF-I, які мають послідовну активацію PI3K/Akt, експресія p16 приглушується у старшому віці, що дозволяє комплексу цикліну D та CDK4/6 утворювати безперебійний перехід фази G1 до S. Показано, що Akt інгібує p21 за рахунок фосфорилування двох його ділянок і забезпечує стійку клітинну проліферацію [129, с. 1]. Показано, що p27 інгібує цикліни G1 та CDK, викликаючи зупинку клітинного циклу. Фосфорилування p27 по Thr-198

за допомогою Akt сприяє деградації p27 [130], рівні білка p53 також знижуються при наявності Akt [131].

Аеробні вправи призводять до збільшення інсулінової сигналізації, що активізує шлях Akt/mTOR та посилює синтез білку в м'язах [132]. Зростаюча кількість ядерного Akt збільшує активність теломерази [133]. Крім того, вікові зміни в експресії Akt впливають на фосфорилування ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS), що, в свою чергу, збільшує ризик вікової гіпертензії [134].

Зв'язок між активністю Akt та гіпертрофічним ремоделюванням незаперечний, як і нещодавнє включення мікроРНК (miRNA) як критичних регуляторів серцевої гіпертрофії та недостатності [135] [136]. Це невеликі РНК, що регулюють експресію генів і контролюють ріст, диференціювання та апоптоз клітин. Конститутивна активація Akt за допомогою серцево-специфічного трансгенезу призводить до зниження норми miRNA-133 та miRNA-1, аналогічно змінам, що спостерігаються після експериментально викликаного перевантаження тиском або гіпертрофії від фізичного навантаження [137]. Важливо, що ремоделювання серця можна стимулювати або гальмувати через активність miRNA. Наприклад, у культивованих кардіоміоцитах надмірна експресія miRNA-1 призводить до гальмування гіпертрофії [138], тоді як експресія декількох індукованих стресом miRNA призводить до гіпертрофічного збільшення розмірів клітин [135]. Ці зміни ще не відображаються на рівні активності Akt. Однак доцільно припустити, що miRNA, які регулюють ремоделювання, виживання клітин та проліферацію, можуть зворотно регулюватися активністю Akt.

1.4. Дефіцит IGF-1 і серцева недостатність.

Зв'язок між рівнями IGF-1 і СН був виявлений на основі обстежень пацієнтів з гіпопітуїтаризмом, в яких знижені рівні гормону росту і IGF-

1, і підвищений ризик виникнення застійної СН [J. Ren, Mol. CellCardiol. 31 (11) (1999) 2049–2061.]. Крім того, в пацієнтів з СН рівні IGF-1 є низькими і корелюють з тяжкістю систолічної дисфункції шлуночків [J. Niebauer, Am. Coll. Cardiol. 32 (2) (1998) 393–397. ; S.D. Anker, Am. Coll. Cardiol. 38 (2) (2001) 443–452.]. Також було показано, що ІМ у людей пов'язаний зі значними змінами в системі IGF-1. Концентрації IGF-1 в сироватці крові під час інфаркту можуть бути використані для прогнозування подальшого розвитку СН [W.L. Lee, Clin. Endocrinol. Metab. 84 (5) (1999) 1575–1581.]. У дослідженні Framingham Heart Study рівні IGF-1 у сироватці були зворотно пов'язаними з ризиком виникнення СН у людей похилого віку без попереднього ІМ [R.S. Vasan, (2003) 642–648.]. Ці дослідження показали, що низькі рівні IGF-1 супроводжують розвиток СН. З огляду на те, що IGF-1 має кардіопротективні ефекти, залишається відкритим питання про динаміку змін експресії цього фактора при розвитку гіпертрофії та його протекторну або патологічну роль.

Стійка надпродукція IGF-1, як у пацієнтів з акромегалією, може призвести до гіпертрофічної кардіоміопатії [J. RenMol. CellCardiol. 31 (11) (1999) 2049–2061.], а хронічна інфузія фармакологічних доз IGF-1 також призводить до слабкої серцевої гіпертрофії у щурів [R.L. Duerr, *Circulation* 93 (12) (1996) 2188–2196.]. Таким чином, виявилось, що IGF-1 має неоднозначний вплив на серце, оскільки і дефіцит IGF-1, і надмірна його кількість може призвести до погіршення функції серця. Той факт, що клітини міокарда можуть регенерувати у відповідь на посилений стрес і робоче навантаження, і те, що IGF-1 захищає клітини міокарда від дегенерації і загибелі, а також стимулює регенерацію, відкриває нові і більш фундаментальні підходи як для лікування так і для профілактики серцевих захворювань. Одним з можливих підходів може

бути використання IGF-1 або речовин, які можуть регулювати його експресію в міокарді, як Hsp60, для запобігання дисфункції міокарда і, можливо, для відновлення пошкодженого міокарда. Нові уявлення про взаємодію між дією Hsp60 і IGF-1 у серцевому м'язі, можливо, визначатимуть внутрішньоклітинні шляхи, які регулюють сигналювання від рецепторів IGF-1 в нормальному режимі і в ураженому серці, і, що може привести до виникнення фармакологічних засобів для лікування СН і діабетичної кардіоміопатії [P.H. Wang, (2001) 552–554.].

Вікові та інші структурні зміни серця, включаючи зміни, пов'язані з інфарктом міокарда, можуть викликати зниження серцевої функції, що в кінцевому рахунку може призвести до застійної СН. Раніше ці зміни вважалися незворотними, це припущення засноване на переконанні, що кардіоміоцити не здатні регенерувати [M.H. Soonpaa, (1998) 15–26.]. Потенційно новий підхід до лікування СН припускався зі спостереження, що IGF-1 може запобігти і/або відтермінувати погіршення функції міокарда та загибелі кардіоміоцитів [P.H. Wang, (2001) 552–554.]. Також є клінічні дані, що свідчать про те, що IGF-1 може бути використаний для стратифікації ризику СН [R.S. Vasan, (2003) 642–648.]. При ішемії/реперфузії міокарда, ІМ і СН часто спостерігається втрата кардіоміоцитів, хоча пізніше збільшення маси міокарда може відбуватися через компенсаторну гіпертрофію міоцитів та/або збільшення відкладення колагену в інтерстиції [G. Olivetti, (1995) 1068–1079.]. На додаток, гострий некроз після ішемічного пошкодження є свідченням того, що запрограмована загибель клітин (апоптоз) є ключовим фактором втрати міоцитів, що супроводжує різні форми захворювання міокарда і навіть відбувається при старінні при відсутності ідентифікованого некрозу [W.R. MacLellan, (1997) 137–144.]. У різних тканинах було продемонстровано, що IGF-1 може запобігти

апоптозу і сприяти виживанню клітин [K. Muta, (1993) 264–271.; Y. Jung (1996) 5112–5117.; C.C. Matthews, (1996) 323–331.], а рецептор IGF-1 може бути центральним регулятором тривалості життя ссавців [M. Holzenberger, (2003) 182–187.].

Інгібування втрати кардіоміоцитів шляхом гальмування шляхів загибелі клітин може представляти собою стратегію для запобігання розвитку СН, адже показано, що IGF-1 знижує апоптоз міоцитів після ІМ у мишей [B. Li, M. Setoguchi, (1999) 1007–1019.], при ішемічно-реперфузійному ушкодженні у щурів [M. Buerke, (1995) 8031–8035.], а також у культивованих кардіоміоцитах щурів [L. Wang, W. Ma, (1998) 516–522.]. Антиапоптотичну дію IGF-1 можна спостерігати при фізіологічних концентраціях, в той час як інші фактори росту не в змозі пригальмувати апоптоз клітин серцевого м'яза, навіть у фармакологічних дозах [L. Wang, W. Ma, (1998) 516–522.].

1.5. МікроРНК-1 як корегулятор IGF-1

На додаток до численних вивчених механізмів і молекул з'являються нові докази того, що некодуючі РНК відіграють важливу роль у фізіології та функції серця, включаючи його розвиток, старіння, вплив на захворювання та кардіопротекцію [139] [140] [141] [142] [143]. Некодуючі РНК являють собою велику родину, які, на відміну від інформаційних матричних РНК (мРНК), не беруть безпосередньої участі в транскрипції генів, але регулюють експресію генів та синтез білка. Найважливішими та найбільш вивченими є мікроРНК (miRNA, miRs), клас малих некодуючих РНК довжиною ~22 нуклеотиди. МікроРНК беруть участь у регуляції експресії генів на посттранскрипційному рівні, як в нормі, так і у численних стрес-індукованих розладах, деградуючи цільові мРНК та / або інгібуючи трансляцію, контролюючи тим самим багато різних процесів і шляхів всередині клітини [144]. Було виявлено сотні

різних мікроРНК і їх функції в різних органах і системах, включаючи серцево-судинну систему, які беруть участь у виникненні різних типів ССЗ, включаючи ІМ [145], індуковану лікарськими засобами кардіотоксичність [146], а також кардіоміопатії [147]. Відповідно до їх ролі в патогенезі ССЗ вони є потенційними біомаркерами ССЗ. Однак перехід від експериментальних даних до клінічного застосування є складним, і звичайно, до використання циркулюючих мікроРНК в клініці ще далеко.

До цього часу більше ніж 2000 мікроРНК були виявлені у мух, в рослинах і вищих організмів [148], і тепер визнано, що вони відіграють ключову роль у регулюванні всіх біологічних процесів у еукаріотів (<http://www.miRbase.org>—27.11.2019), а понад 200 з них виявлено в серці або пов'язано з серцево-судинними захворюваннями [149]. Серед усіх інших, мікроРНК-1 переважно експресується в серці, що охоплює близько 40% всіх транскриптів мікроРНК серця [150]. МікроРНК-1 має вирішальне значення для розвитку серця, а саме для проліферації та диференціювання кардіоміоцитів, а також для прогресування серцево-судинних захворювань (реоксигенація, гіпоксія, гіпертрофія, СН, аритмія тощо) та вікових змін [151] [152]. Більшість досліджень орієнтовані на зміну рівня зрілих мікроРНК1. Раніше було показано, що аноксія-реоксигенація впливає на рівень як зрілої, так і незрілої мікроРНК-1 у первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів [153]. Нещодавно виявлено патологію регуляції мікроРНК-1 у клітинах гладеньких м'язів судин спонтанно-гіпертензивних щурів [154, с. 1]. З іншого боку, було показано, що перехід від гіпертрофії міокарда до СН супроводжується реактивацією експресії генів плода та змінами у будові серця [155].

При дослідженні змін експресії мікроРНК протягом 14 днів при перевантаженні тиском, виявлено, що miR-1 була єдиною мікроРНК,

рівень якої знижувався з першого дня [156]. Кардіоспецифічна гіперекспресія miR-1 веде до репресії генів-мішеней, таких як ген, що кодує білок-активатор Ras (RasGAP), циклін-залежну кіназу 9 (Cdk9), фібронектин, і подальше зменшення гіпертрофічного росту серця, зниження фіброзу та апоптозу кардіоміоцитів і поліпшення сигналізації кальцію [157]. Інші мішені miR-1 з прямим впливом на клітини серця – це інсуліноподібний фактор росту (IGF1) і IGF1-рецептор (IGF1-R) [75]. Хоча IGF1 нормально зв'язується з його рецептором, викликаючи активацію різних шляхів, включаючи PI3K/АКТ, і інгібуючи фактор транскрипції FOXO3A, модуляція будь-якого з цих факторів в кардіоміоцитах безпосередньо впливає на рівні експресії miR-1. Тоді як трансфекція АКТ зменшує експресію miR-1, надекспресія FOXO3A викликає збільшення рівнів miR-1 [75]. У моделі перевантаження тиском, підвищення рівнів IGF1 внаслідок репресії miR-1 також супроводжується підвищенням циркулюючого білка для зв'язування жирних кислот (FABP3), невеликого білка, що залучений до метаболізму в серці, який секретується в кров і потенційно може бути використаний як біомаркер, що відображає функцію міокарда [158, с. 1]. У цілому ці результати демонструють, що взаємодія miR-1 - IGF1 може бути залучена до багатьох процесів регуляції функції серця.

Наведені дані свідчать про важливість дослідження рівнів експресії miR-1 для встановлення механізмів регуляції розвитку гіпертрофії міокарда та СН. Однак в умовах гіпертрофії серця, викликаній ІЗО, досі не було досліджено регуляторний зв'язок IGF1- miR-1.

Таким чином, потребує детальних досліджень динаміка розвитку гіпертрофії міокарда, гострої і хронічної, та її молекулярні механізми, що зумовило мету цього дослідження.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Об'єкт дослідження.

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).

Експериментальна модель термінової гіпертрофії міокарда шляхом β -адренергічної стимуляції. Тварини отримували ін'єкції агоніста β -АР 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.

2.2. Моделювання гіпертрофії серця шляхом β -адренергічної стимуляції.

Агоніст β -АР ІЗО (Sigma, USA) розчиняли у фізіологічному розчині. Тварини отримували ін'єкції ІЗО у концентрації 5 мг/кг (в об'ємі приблизно 0,5 мл) підшкірно в міжлопатковій ділянці спини щоденно протягом 7 діб. Групою порівняння слугували тварини, яким протягом 7 діб з інтервалом 24 години вводили підшкірно фізіологічний розчин в об'ємі 0,5 мл.

2.3. Метод реєстрації та аналізу кардіодинамічних показників *in vivo*.

Тварин наркотизували уретаном із розрахунку 1,5г на 1кг маси тварини. Тварину фіксували на операційному столі, препарували праву сонну артерію. Стандартний 2F мікрокатетер для реєстрації тиску-об'єму з відстанню між сигнальними електродами у 9,0 мм (SPR-838; Millar Instruments, Houston, TX) калібрували за об'ємом шляхом занурення

катетера у калібрувальну кювету (P/N 910-1048), яка складає ряд циліндричних отворів відомого діаметру (від 2 до 15 мм) та об'єму (від 28,27 до 1590 мкл), заповнених кров'ю щура з додаванням гепарину. Катетер вводили через праву сонну артерію ретроградно у ЛШЛ 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 ЛШЛ 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 ($\text{slope } 20,25 * \text{RVU} - \text{intercept } 29,05$).

Застосування системи MPVS 400 та міркатетеру дозволяє миттєво отримувати криві, що описують залежність тиску від об'єму ЛШЛ протягом кожного серцевого циклу (рис. 2.1.А). В реальному часі отримуємо показники максимального та мінімального тиску, частоти серцевих скорочень, об'єму ЛШЛ, а також першої похідної тиску – dP/dt (рис. 2.1.Б).

А

Б

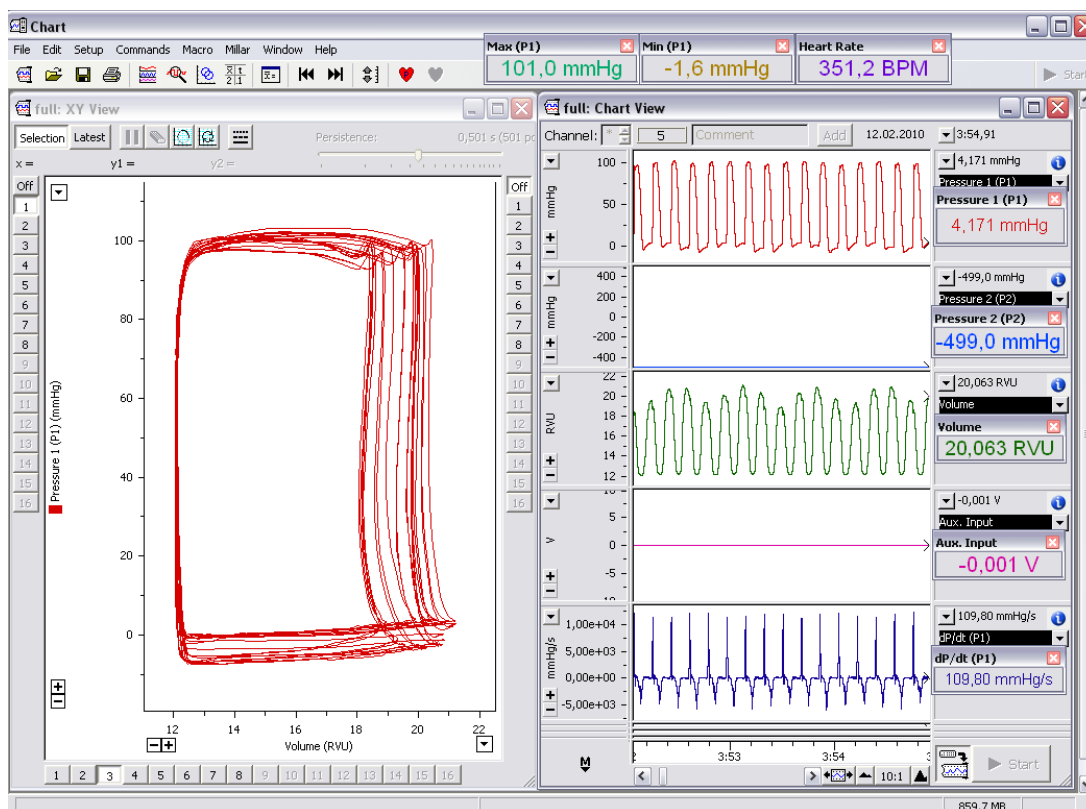


Рис. 2.1. Нативні криві залежності тиску від об'єму (А) та тиск, об'єм ЛШЛ і dp/dt_{max} зверху вниз відповідно (Б).

Запис показників кардіодинаміки було здійснено у двох режимах: у вихідному стані та за умов тимчасової (протягом 7-10с) оклюзії нижньої порожнистої вени.

Гемодинамічні параметри, що реєструвалися та аналізувалися, можна поділити на декілька груп: насосна функція, діастолічна функція, скоротлива активність, переднавантаження, постнавантаження, артеріально-шлуночкове спряження.

2.4. Дослідження скоротливої функції серця при тимчасовій оклюзії нижньої порожнистої вени.

Застосування системи MPVS 400 за умов тимчасової оклюзії черевної порожнистої вени дає змогу оцінити незалежні від навантаження показники роботи серця. Після реєстрації вихідних показників

кардіодинаміки здійснювали невеликий розріз нижче мечевидного відростку. Нативний запис отриманих кривих представлено на рис. 2.2.

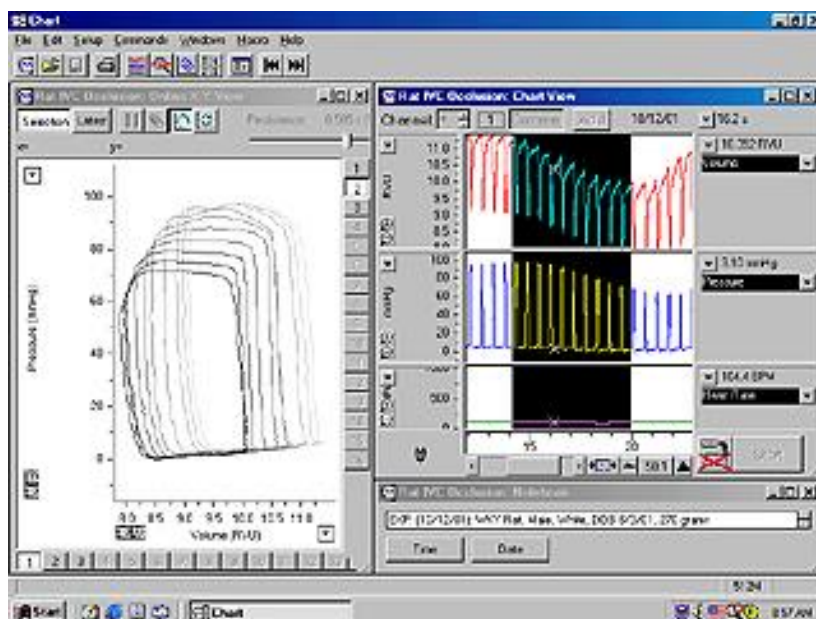


Рис. 2.2. Нативний запис кривих при тимчасовій оклюзії нижньої порожнистої вени.

За концепцією Sugai Sagawa [159], ЛШЛ серця характеризується змінною у часі жорсткістю. В кожній точці серцевого циклу еластичні властивості ЛШЛ можна оцінити за допомогою жорсткості міокарда (ЖМ), яка збільшується при переході серця із діастолічної фази у систолу. У межах цієї концепції при тимчасовій оклюзії нижньої порожнистої вени або аорти визначають такі показники: кінцево-систолічне співвідношення тиску-об'єму, кут нахилу якого є індексом кінцево-систолічної жорсткості міокарда ($ЖМ_{кc}$), максимальне значення жорсткості міокарда ($ЖМ_{max}$), кінцево-діастолічне співвідношення тиску-об'єму, кут нахилу якого відображує здатність міокарда до розтягнення, або його кінцево-діастолічну жорсткість ($ЖМ_{кд}$) (рис. 2.3) [Burkhoff D., 2005, Pacher P., 2008]. Зазначений підхід дає можливість оцінити максимальний резерв скоротливої активності ($ЖМ_{max}$ та $ЖМ_{кc}$), що у дослідженнях Меєрсона [Меєрсон Ф.З., 1965] досягалося встановленням величини максимального

тиску ЛШЛ (P_{\max}) із подальшою можливістю побудови кривої, аналогічної кінцево-сistolічному співвідношенню тиску-об'єму. Індeksi $ЖМ_{\max}(E_{\max})$ та $ЖМ_{\text{кc}}(E_{\text{es}})$ широко використовуються для оцінки скоротливості міокарда. Ці показники вказують на ступінь максимального або кінцево-сistolічного стискання міокарда ЛШЛ, нормалізованого до об'єму ЛШЛ. Відомо, що вказані індeksi є відносно незалежними від перед- та постнавантаження.



Рис. 2.3. Схематичне зображення кривих залежності тиску-об'єму та похідних: кінцево-сistolічного та кінцево-діастолічного співвідношень, а також $ЖМ_{\text{кc}}$, $АЖ$.

$АЖ/ЖМ$ є важливою детермінантою функції серця (Kass, 2005) та серцевого енергетичного стану (Starling, 1993). Відповідне співвідношення між ЛШЛ та артеріальною системою за умов спокою призводить до оптимальної передачі крові з ЛШ до периферії без надлишкових змін тиску; до оптимальної ударної роботи, енергетичної ефективності, тобто, кількості енергії, спожитої міокардом для розвитку необхідної ударної роботи (Borlaug B.A., 2008). Співвідношення $АЖ/ЖМ$ у межах 0.6–1.2 у

стані спокою (Borlaug B.A., 2008), як вважають, описує оптимальну взаємодію між системами ЛШ та судин, а також вказує на близький до оптимального баланс між механічною та енергетичною ефективністю (Starling, 1993). Цікаво, що цей рівень спостерігається і у інших видів (Little W.C., 1991, vandenHorn G.J., 1985), що свідчить про еволюційну консервативність цього механізму. При розвитку СН описано зміни в сторону збільшення цього індексу (Chantler P.D., 2008).

2.5. Метод фарбування гістологічних препаратів за Ван Гізоном.

Після закінчення функціональних досліджень серце тварини швидко виймали з грудної порожнини у охолоджений фізіологічний розчин, надалі висушували за допомогою фільтрувального паперу, зважували. Таким чином отримували значення співвідношень маси серця (мг) до маси тіла тварини (г).

Для визначення розвитку фіброзу в міокарді застосовувався метод виявлення сполучної тканини по Ван-Гізону [Меркулов Г.А., 1955]. Для об'єктивного оцінювання рівня розвитку фібротичних процесів заморожені серця розрізали на чотири частини товщиною 3-4 мм (поперечні зрізи), після чого за допомогою мікротому з кожної частини серця отримували тонкі заморожені зрізи (10-12 мкм), які фіксувалися в 96% етанолі протягом 20 хв. та інкубувалися в насиченому розчині пікринової кислоти протягом однієї години. Надалі послідовно здійснювались наступні операції: інкубація в 0,5% розчині льодяної оцтової кислоти 10-30 сек., інкубація в суміші кислого фуксину та насиченого розчину пікринової кислоти 1:10, промивка у дистильованій воді, фіксація в 96% етанолі. Пофарбовані зрізи сканувалися та отримані цифрові зображення аналізувалися за допомогою спеціалізованої морфометричної програми ImageJ (National Institutes of Health, USA).

2.6. Електронна мікроскопія зразків

Відібрані зразки тканин серця фіксували протягом 120 хв розчином наступного складу: параформальдегід (2%), глутаральдегід (2,5%) в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4) з подальшою постфіксацією 1% буферним розчином осмію тетроксиду. Потім зразки дегідрували, проводячи їх через розведення спиртів (від 60% до 100%), та заливали епоксидною смолою. Полімеризацію смоли проводили при 60°C протягом 24 год. Ультратонкі зрізи клітин обробляли ураніл ацетатом та цитратом свинцю для контрастування матеріалу. Зразки досліджували з використанням електронного мікроскопу Jem – 100 CX (Японія).

2.7. Визначення експресії білків методом Western Blotting.

Експресію продукту гена IGF-1 визначали у заморожених зразках тканин методом імуноблотингу за протоколом BIO-RAD Labs.

2.7.1. Приготування зразків. Заморожені органи розтирали у фарфоровій ступці з додаванням рідкого азоту до утворення дрібного порошку. На електронних вагах у попередньо охолоджених пробірках швидко, не розморожуючи, зважували по 500 мг порошку та переносили пробірки на лід. Зразки змішували з лізис-буфером 50 mM TrisHCl, 0,5 media, 2mM DTT, 0,2 mM PMSF, 10% гліцерил, 0,1% Тритон X-100 та коктейль інгібіторів протеаз - по 10 мкл на кожен мл буфера) у співвідношенні 1:2, гомогенізували протягом 1хв. в ультразвуковому гомогенізаторі та витримували на льоду протягом 30 хв.

Після цього зразки центрифугували 20 хв. при 12 000 об/хв., відбирали 10 мкл супернатанту для визначення концентрації білку та 60 мкл - для електрофорезу. Зразки для електрофорезу змішували з 20 мкл буферу для зразків (0,25 M TrisHCl, 40% гліцерил, 8% SDS, 400 mM DTT, 0,02

бромфеноловий синій, 5 % бета-меркаптоетанол) і денатурували протягом 7 хв. на киплячій водяній бані.

2.7.2. Визначення вмісту білку у зразках. До 100 мкл супернатанту додавали 40 мкл 4% розчину CuSO_4 та 1960 мкл біцинхонінової кислоти (SIGMA, США) й інкубували при 37°C протягом 30 хв.). Оптичну щільність визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 562 нм. Вміст білку визначали за калібрувальною кривою, побудованою за стандартними розведеннями бичачого сироваткового альбуміну. Для внесення в гель розраховували об'єм зразка, який містить 100 мкг білку.

2.7.3. Проведення електрофорезу. Денатуровані зразки розділяли за допомогою вертикального гелі-електрофорезу у системі SDS-PAGE з використанням установки MINIPROTEAN3 (BIO-RAD, США). Для розділення зразків використовували 7,5 % поліакриламідний гель: акриламід:біс акриламід (29:1), 31% розчин - 2,5 мл; TrisHCl, 1,5 М розчин, pH 8,8 - 2,5 мл; додецилсульфат натрію, 10% розчин - 0,1мл; персульфат амонію, 10% розчин - 0,05 мл; TEMED - 5 мкл; деіонізована вода - 4,85 мл). Лунки геля заповнювали наступним чином: 1- буфер для зразків, 2- суміш стандартів молекулярної маси, 3- розчин альбуміну сироватки бика, 4-9 – денатуровані зразки, 10- буфер для зразків. Розділення проводили перші 10 хв при 100 V для ущільнення геля і далі при 200 V до моменту досягнення фронтом нижнього краю геля. Для перевірки якості розділення застосовували пофарбування гелю барвником Кумасі.

2.7.4. Проведення трансфера. Трансфер проводили, використовуючи установки MINITRANSBLOTCELL (BIO-RAD, США). Установку заповнювали трансфер-буфером (50 мМ Tris основний, 380 мМ гліцин, 0,1% SDS). Для фіксації білка використовували PVDF-мембрану.

Трансфер проводили 1 годину при 100 V і 0,35 А. Якість трансферу перевіряли пофарбуванням мембрани за допомогою Понсо-С.

2.7.5. Обробка антитілами. Мембрану після трансферу блокували за допомогою блокуючого розчину (фосфатний буферний розчин (PBS) + 5% Tween -20 + 1% BSA), потім мембрану інкубували 2 год. з першими антитілами, розведеними у буфері для антитіл (PBS+1% желатини). Використовували козячі поліклональні анти-IGF-1 антитіла (SantaCruzBiotechnology, США) в розведенні 1:200. Після відмивання на шейкері 4 рази по 5 хв., використовуючи по 15 мл відмивального буфера, обробляли для виявлення експресії за допомогою ProteoQuestColorimetricKit (SIGMA, США).

Мембрану інкубували 1 год. з другими антитілами, кон'югованими з лужною фосфатазою, використовували кролячий анти-козячий IgG в розведенні 1:5000. Після цього відмивали на шейкері 4 рази по 5 хв, використовуючи по 15 мл відмивального буфера.

Безпосередньо перед використанням готували розчин субстрату: 66 мкл розчину нітросиньоготетразолію в 70% диметилформаміді поєднували з 33 мкл розчину BCIP у 100% диметилформаміді, і розчиняли в 10 мл буфера для лужної фосфатази, рН=9.5. Мембрану інкубували у субстратній суміші до проявлення пурпурового забарвлення, яке виявляло комплекс антиген-антитіло на мембрані. Мембрану висушували між листками фільтрувального паперу в потоці холодного повітря, піддавали скануванню та комп'ютерній денситометрії. Результати представляли в умовних одиницях інтенсивності забарвлення (у. од.)

2.8. Дослідження експресії гена IGF-1 методом ПЛР-аналізу.

2.8.1. Виділення сумарної мРНК. Тканину серця щура отримували з ділянки верхівки ЛШЛ. Виділення РНК із тканини серця проводили із методом, що базується на використанні *Trizol* реагенту, що містить

гуанідинізотіоціонат, який призначений для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрису, денатурації клітинних рибонуклеаз, а також білків. Після цього РНК екстрагували в розчин фенол-хлороформу при центрифугуванні, відмивали від білків та переносили у стерильні вільні від ДНК та РНК мікропробірки. Отримана РНК безпосередньо використовувалася для проведення зворотної транскрипції. В процесі виділення РНК ми дотримувалися рекомендацій, наведених у комерційному наборі, та проводили маніпуляції згідно протоколу. Концентрацію РНК у зразку вимірювали за допомогою спектрофотометра NanoDrop.

2.8.2. Метод зворотної транскрипції. Зворотну транскрипцію проводили із використанням RevertAid™ H Minus FirstStrandc DNASynthesisKit (Fermentas, Литва), застосовуючи 500 нг загальної РНК та олігомерний (dT)₁₈праймер. Отриману одноланцюгову ДНК (кДНК) використовували для полімеразної ланцюгової реакції із застосуванням відповідних праймерів або флуоресцентних олігонуклеотидних зондів.

2.8.3. Полімеразно-ланцюгова реакція у реальному часі. Отриману кДНК використовували для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі із застосуванням наступних детекційних систем (Applied Biosystems, США): для визначення експресії гену IGF-1. Програма ампліфікації складалася з початкової денатурації при 95°C протягом 20 с та з 45 циклів денатурації (95°C - 3 с), приєднання праймерів та елонгації (60°C - 30 с) та проводилася за використання системи 7500 FastReal-timePCR (AppliedBiosystems, USA). Для стандартизації даних застосовували TaqManRodent GAPDH Control Reagent (VIC™Probe). Експресію гену IGF-1 визначали із застосуванням флуоресцентного барвника SYBR-Green та наступних праймерів: IGF Up: 5`-TGGACCCAGTATGCAGTCTATG-3` IGF Dw: 5`-AGCTGAGAGGAGGAGTTTGATG-3`.

Експресію генів стандартизували відносно експресії гена β -актину, як ендogenous контролю. ПЛР-ампліфікація генів IGF-1 проводилася у 10 мкл SYBRGreenPCRMasterMix, що містив 40 пмоль кожного праймеру. Об'єм доводили до 20 мкл дейонізованою водою. Ампліфікацію здійснювали за допомогою термоциклеру “7500 FastReal-TimePCRSystem”. Програма ампліфікації починалася із попередньої активації AmpliTaqGold® ДНК-полімерази протягом 10 хв при 95 та включала 45 циклів, кожен з яких складався з денатурації при 95°C (19 с), приєднання праймерів та елонгації при 58°C (1 хв). Для контролю специфічності проводили стадію плавлення ампліфікатів – послідовне підвищення температури від 58 до 95°C із реєстрацією падіння інтенсивності флуоресценції комплексів двохланцюгових ДНК з SYBRGreen. Визначали відносний рівень експресії генів із застосуванням загальноприйнятої методики (рівень експресії = $2^{-\Delta C_t}$, де C_t – пороговий цикл ампліфікації).

2.9. Статистичний аналіз експериментальних результатів.

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 Стюдента 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 $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ТЕРМІНОВОЇ ТА СТАЛОЇ ГІПЕРТРОФІЇ СЕРЦЯ У ЩУРІВ ЛІНІЙ WISTAR І SHR

В цьому розділі представлені результати дослідження змін кардіодинаміки, морфології серця дорослих щурів лінії Wistar і SHR при ізопротеренол-індукованій гіпертрофії. Вивчали рівні експресії генів IGF-1, miRNA1 та білків IGF-1, Akt, SERCA, HSP60 та дистрофіну.

3.1. Розвиток гіпертрофії у експериментальних тварин

Для оцінки розвитку термінової гіпертрофії було проведено експерименти на щурах Wistar, гіпертрофію викликали введенням ІЗО та оцінювали в динаміці за допомогою індекса маси серця, що вираховували як відношення маси серця (мг) до маси тіла тварини (г).

Сталу гіпертрофію, яка хронічно розвивалася за умов постнавантаження на серце внаслідок впливу артеріальної гіпертензії у SHR, а також за умов додаткового впливу на них ІЗО, оцінювали аналогічним чином. Встановлено, що адренергічна стимуляція супроводжувалася прогресивним ростом гіпертрофії ЛШЛ серця у щурів обох ліній до 7 доби експерименту (рис. 3.1). Після завершення введення ізопротеренолу у щурів лінії Wistar відбувалася регресія гіпертрофії міокарда (на 54% на 14 добу і на 98% на 30 добу). У щурів лінії SHR показники були вищими на всіх стадіях експерименту, спостерігали різке зростання концентричної гіпертрофії вже у перші 3 доби, що призводило до значної летальності (65% тварин) внаслідок різкого погіршення насосної функції серця. У щурів лінії Wistar не спостерігали летальності

під час експерименту. Після завершення адренергічної стимуляції у щурів SHR не відбулося значної регресії гіпертрофії протягом місяця.

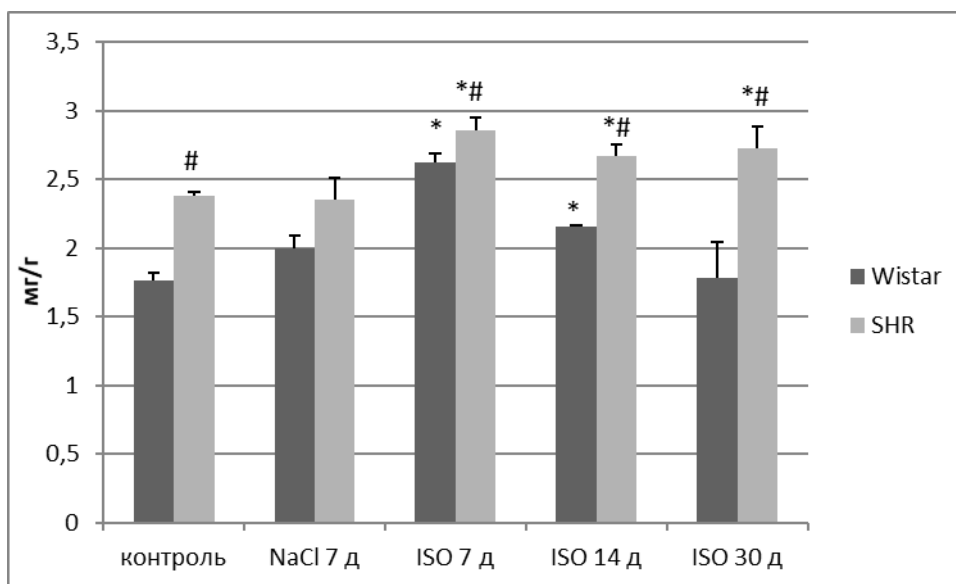


Рисунок 3.1. Відношення маси серця (мг) до маси тіла тварини (г) (LV/m, мг/г) у щурів лінії Wistar та SHR. *P<0,05 порівняно з вихідним рівнем; #P<0,05 порівняно з Wistar.

Оцінка площі фібротичних змін у міокарді через добу після завершення введення ІЗО продемонструвала зростання фіброзу в серці щурів обох ліній (рис. 3.2). Цікаво, що показники були вищими у щурів лінії Wistar, що може свідчити про активність компенсаторних механізмів, які зменшують адренергічні пошкодження серцевого м'яза, у SHR.

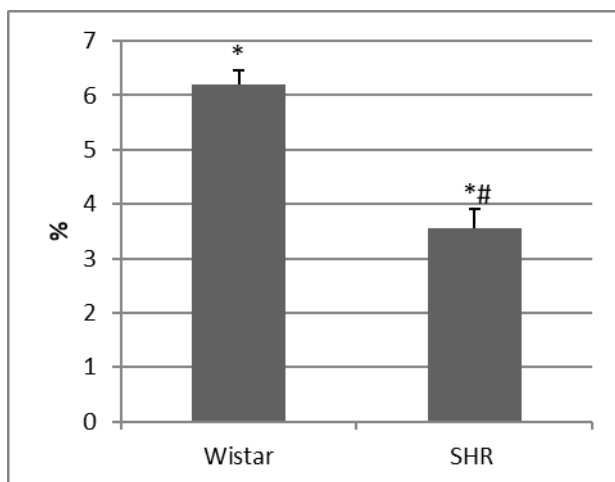


Рисунок 3.2. Відсоток сполучної тканини у міокарді щурів лінії Wistar та SHR після введення ізопротеренолу протягом 7 діб. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем; # $P < 0,05$ порівняно з Wistar.

3.2. Кардіогемодинаміка під впливом введення ІЗО.

Для оцінки впливу розвитку гіпертрофії на функцію серця було проведено експерименти на щурах Wistar (без наявності гіпертрофії) та SHR з сталою гіпертрофією лівого шлуночка. Термінову гіпертрофію викликали введенням ізопротеренолу. Функцію серця оцінювали через 7 діб експерименту.

Незважаючи на широкі дослідження функціонального стану серця при його гіпертрофії, яка була викликана впливом тривалої адренергічної стимуляції ІЗО, дуже часто аналізу підлягають лише окремі показники роботи серця. Тому, під питанням залишається комплексна оцінка функціонування серця, яку можна здійснити на основі отриманих кривих залежності тиску-об'єму ЛШЛ. Використання системи для реєстрації залежності тиску-об'єму ЛШЛ у щурів *in vivo* – дозволило нам підійти до оцінки функціонального стану серцево-судинної системи комплексно і розглянути окремо кожну з фаз серцевого циклу.

Здатність серця виконувати насосну функцію оцінювалася за допомогою ряду кардіодинамічних параметрів, які дають глибоке уявлення про стан серцево-судинної системи в цілому, а будь-які порушення в них є результатом серйозних порушень в діяльності організму.

При сталій гіпертрофії внаслідок збільшеного постнавантаження на серце у щурів SHR спостерігалось зменшення ЧСС на 17%. Введення ІЗО супроводжувалось достовірним зниженням ЧСС у щурів Wistar на 6,8%, а у щурів SHR – збільшенням на 22,4% (рис. 3.3). Таким чином, ІЗО

протиспрямовано змінював ЧСС у щурів з наявністю сталої гіпертрофії та без неї.

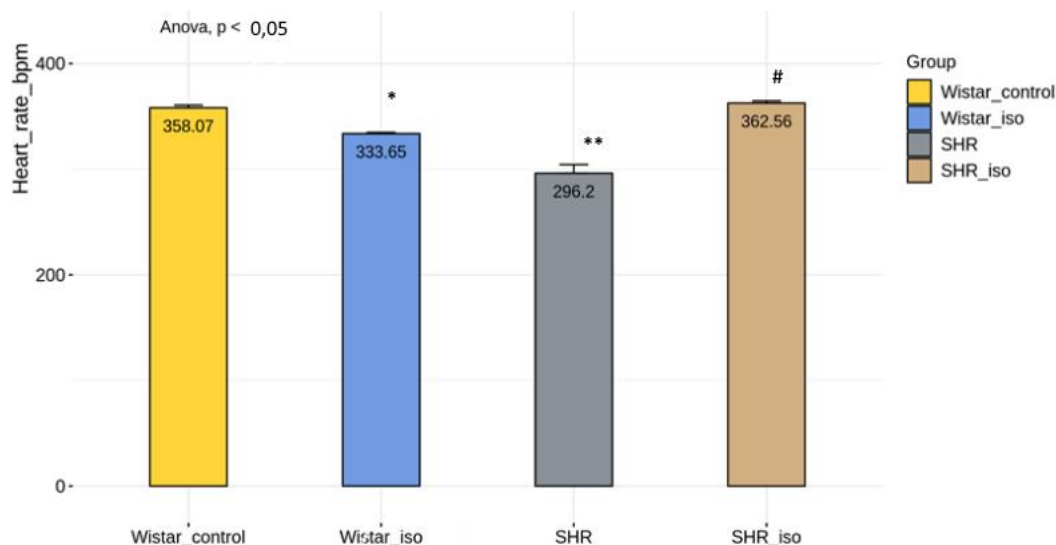


Рис 3.3. Вплив ІЗО на ЧСС у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі).
*P<0.05 проти Wistar, # P<0.05 проти SHR.

Фракція викиду (ФВ) – це частка крові, що викидається з лівого шлуночка під час систоли. Цей параметр є одним з основних для оцінки ефективності роботи серця. У щурів SHR ФВ була достовірно нижчою на 44,4% порівняно зі щурами Wistar. Введення ISO викликало достовірне зниження EF на 43,6% у щурів Wistar і лише на 5,5% - у SHR (рис. 3.4).

Такий показник як ударний об'єм (УО) є одним з найважливіших параметрів ефективності насосної функції серця, на який може впливати багато факторів, таких як: зміна переднавантаження (у відповідності до закону Франка-Старлінга), а також зміна постнавантаження (в залежності від тяжкості артеріальної гіпертензії або коарктації аорти тощо).

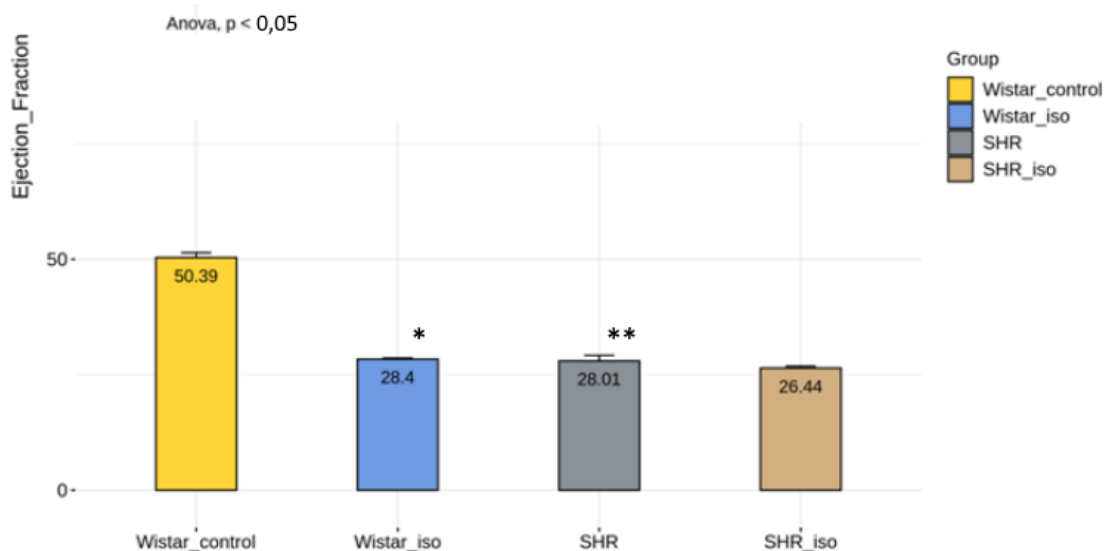


Рис. 3.4. Вплив ІЗО на фракцію викиду у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ проти Wistar.

УО у щурів SHR був достовірно знижений на 30,6% порівняно зі щурами Wistar. Введення ІЗО достовірно знижувало SV на 38,4% у щурів Wistar, і не впливало у SHR (рис.3.5).

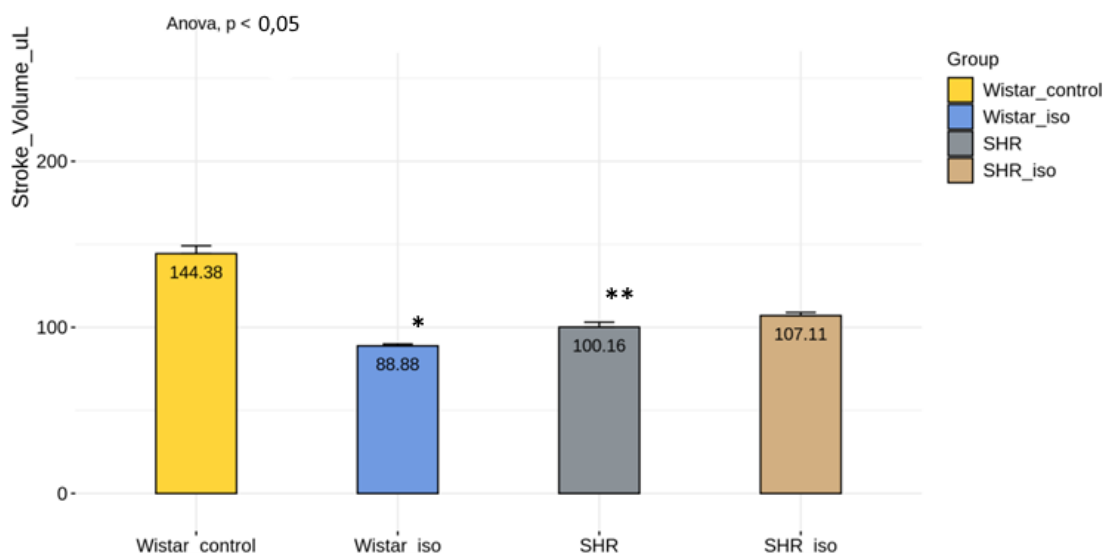


Рис.3.5. Вплив ІЗО на ударний об'єм у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ проти Wistar.

Ударна робота (УР) – це параметр, що характеризує роботу за одиницю часу, яку виконує ЛШЛ, щоб здійснити викид крові проти тиску в аорті. В наших дослідях введення ІЗО супроводжувалось достовірним зниженням SW у щурів Wistar на 56,7% та збільшенням SW у щурів SHR на 239,4%. При цьому варто зазначити, що SW щурів SHR була на 73,8% нижчою, ніж у щурів Wistar (рис.3.6).

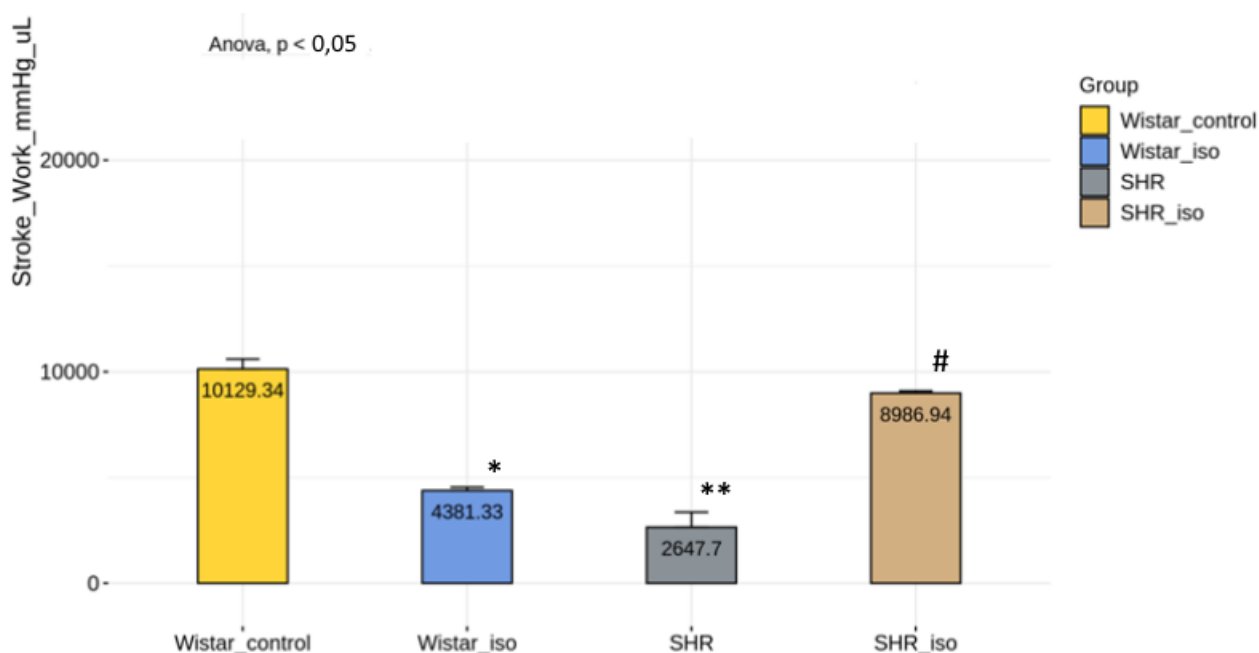


Рис. 3.6. Вплив ІЗО на ударну роботу у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). *P<0.05, ** P<0.01 проти Wistar, # P<0.05 проти SHR. Введення ІЗО супроводжувалось достовірним зниженням хвилинного об'єму крові (ХОК) на 42,3% у щурів Wistar і збільшенням ХОК на 26% у щурів SHR. При цьому значення ХОК у щурів SHR було на 39,2% меншим, ніж у щурів Wistar (рис.3.7).

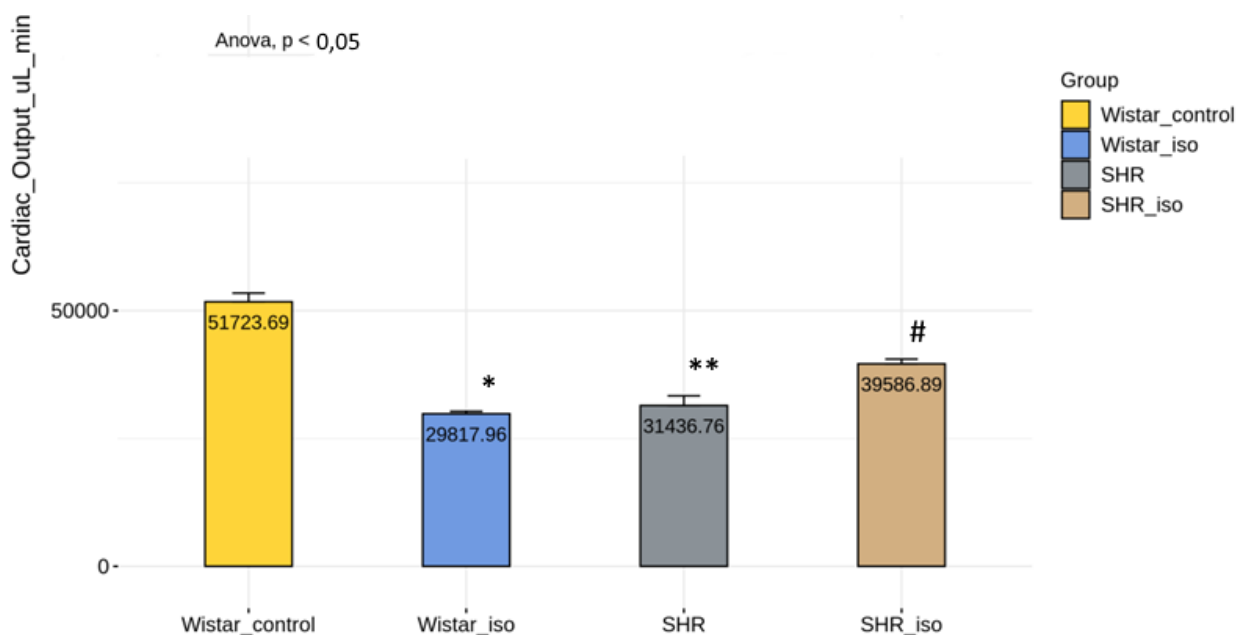


Рис. 3.7. Вплив ІЗО на хвилинний об'єм крові у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). * $P < 0.0$, ** $P < 0.01$ проти Wistar, # $P < 0.05$ проти SHR.

Діастолічну функцію серця аналізували за результатами отриманих показників КДО, КДТ, dP/dt_{min} , τw .

Крім належної кардіоміоцитам здатності до розслаблення, на діастолічну функцію серця впливає також геометрія ЛШ і властивості порожнини ЛШ. Кінцево-діастолічний об'єм (КДО), який характеризує діастолічну функцію, достовірно збільшувався за дії тривалої адренергічної стимуляції як у щурів Wistar на 13,7%, так і у щурів SHR на 24%. При цьому у щурів SHR КДО був достовірно збільшений на 19,8% (рис. 3.8.).

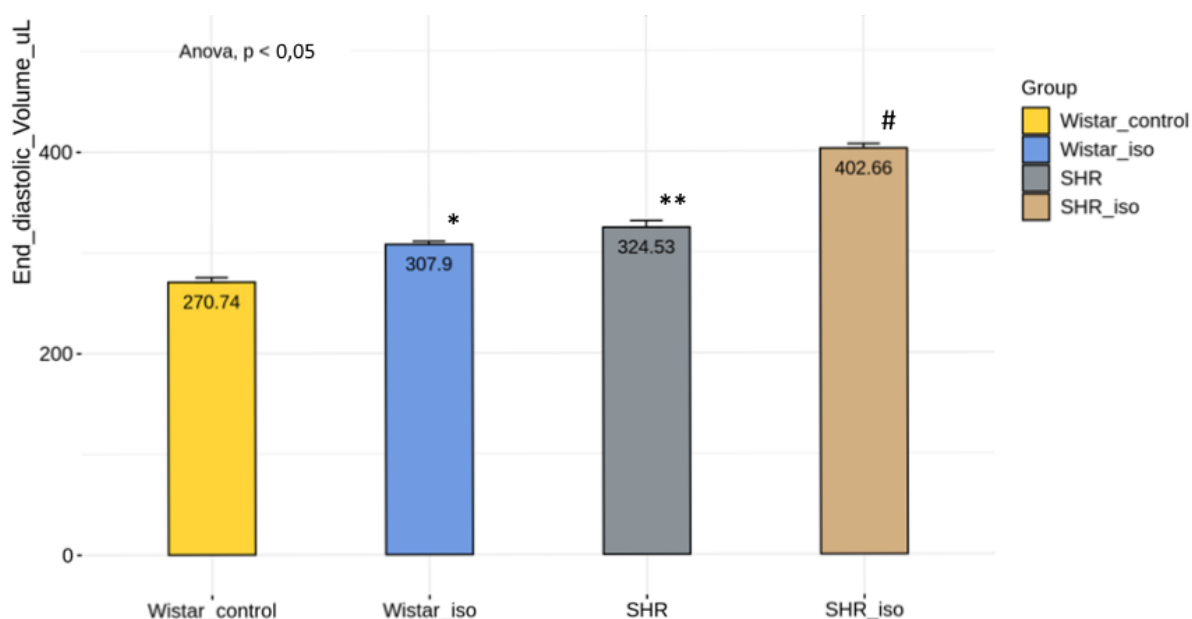


Рис. 3.8. Вплив ІЗО на кінцево-діастолічний об'єм у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ проти Wistar, # $P < 0.05$ проти Wistar.

Кінцево-діастолічний тиск (КДТ) не змінювався під дією ІЗО у щурів Wistar, але збільшувався вдвічі у щурів SHR (рис.3.9.). Таким чином, оцінка співвідношення КДО/КДТ дозволяє говорити про збільшення кінцево-діастолічної жорсткості порожнини ЛШ і відсутність дилатації ЛШ. Ці зміни пов'язані зі збільшенням пасивної жорсткості міокарду, яка може бути зумовлена розвитком гіпертрофічних змін міокарда.

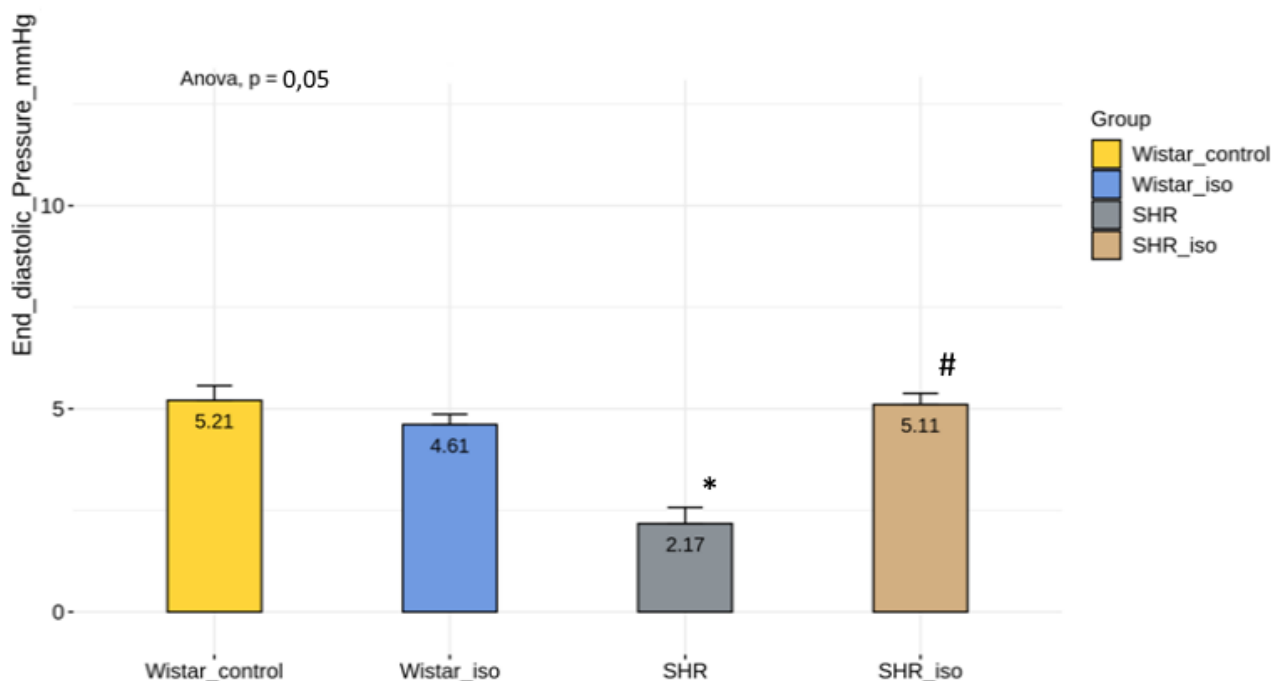


Рис. 3.9. Вплив ІЗО на кінцево-діастолічний тиск у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). *P<0.05 проти Wistar, # P<0.05 проти Wistar.

dP/dtmin або максимальна швидкість розслаблення міокарду є показником, що дозволяє оцінити ефективність розслаблення шлуночка в діастолі, проте цей показник, як відомо, є відносно залежним від умов навантаження серця. Встановлено достовірне зменшення величини максимальної швидкості розслаблення міокарду Wistar на 33%, та не значуще зменшення у щурів SHR, за дії ІЗО. При цьому у щурів SHR dP/dtmin була збільшена на 17% (рис. 3.10).

Ізовольюмічна константа розслаблення лівого шлуночка τ_w є одним з найбільш достовірних показників діастолічного розслаблення, адже є залежною від переднавантаження. Використання новітніх індексів – констант тривалості періоду ізовольюмічного розслаблення – τ – дозволило виявити, що у щурів SHR τ_w був більшим на 38% в порівнянні з Wistar. При дії тривалої адренергічної стимуляції ІЗО спостерігалось зниження τ

w на 25% у SHR, при цьому у щурів Wistar цей показник не змінювався (рис. 3.11.), це може вказувати на відстрочення розслаблення чи подовження періоду ранньої діастолі, коли відбувається закачування йонів кальцію до внутрішньоклітинних депо.

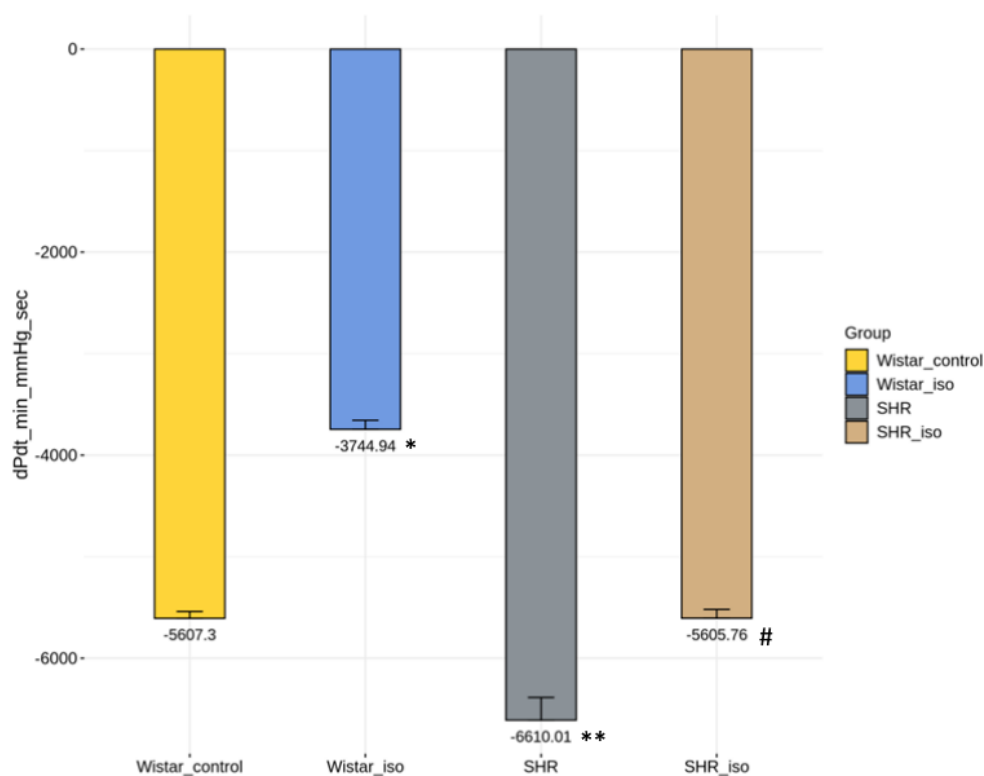


Рис. 3.10. Вплив ІЗО на швидкість розслаблення лівого шлуночка у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). *P<0.05, ** P<0.01 проти Wistar, # P<0.05 проти Wistar.

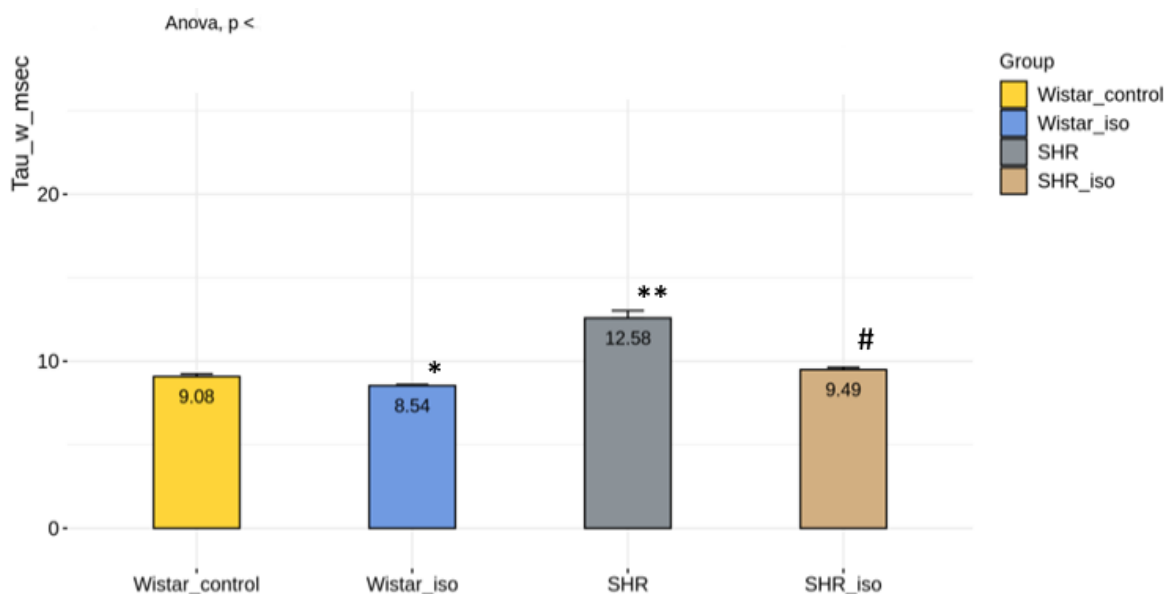


Рис. 3.11. Вплив ISO на ізовольомічну константу розслаблення лівого шлуночка серця τ_w визначена за методом Вайса у щурів Wistar та SHR ($n=9-12$ в кожній групі). ** $P<0.01$ проти Wistar, # $P<0.05$ проти SHR.

Скоротливу функцію серця ми оцінювали за показниками: кінцево-сistolічний об'єм (КСО), кінцево-сistolічний тиск (КСТ), dP/dt_{max} . Досі залишається дискусійним питання про скоротливість гіпертрофованого міокарда.

Кінцево-сistolічний об'єм (КСО) є найменшим об'ємом лівого шлуночка, тому він залежить від здатності серця до скорочення та від постнавантаження. Введення ІЗО збільшувало КСО на 67% у щурів Wistar та не змінювало КСО у щурів SHR. При цьому значення КСО було достовірно вищим (на 136%) у щурів SHR (рис. 3.12).

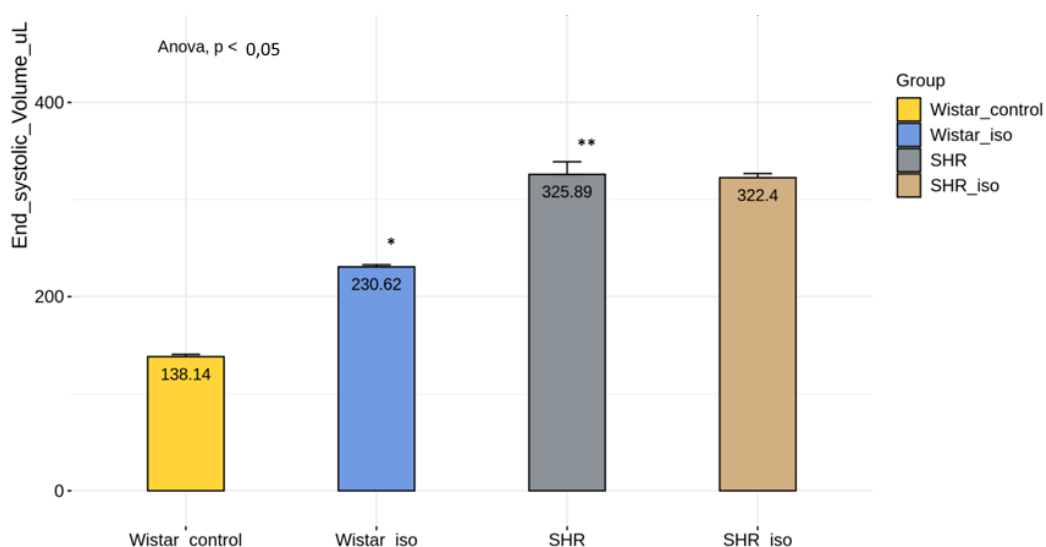


Рис. 3.12. Вплив ІЗО на кінцево-сistolічний об'єм у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). *P<0.0, P<0.01 проти Wistar.

Кінець фази систолічного скорочення характеризується найвищим тиском у серці. Тому кінцево-сistolічний тиск (КСТ) він є залежним від переднавантаження згідно з законом Франка-Старлінга. Введення ІЗО супроводжувалось достовірним зниженням КСТ на 21,5% у щурів Wistar і достовірним збільшенням на 61,4% у щурів SHR. При цьому ми не виявили відмінностей в значеннях КСТ між щурами ліній Wistar і SHR (рис. 3.13).

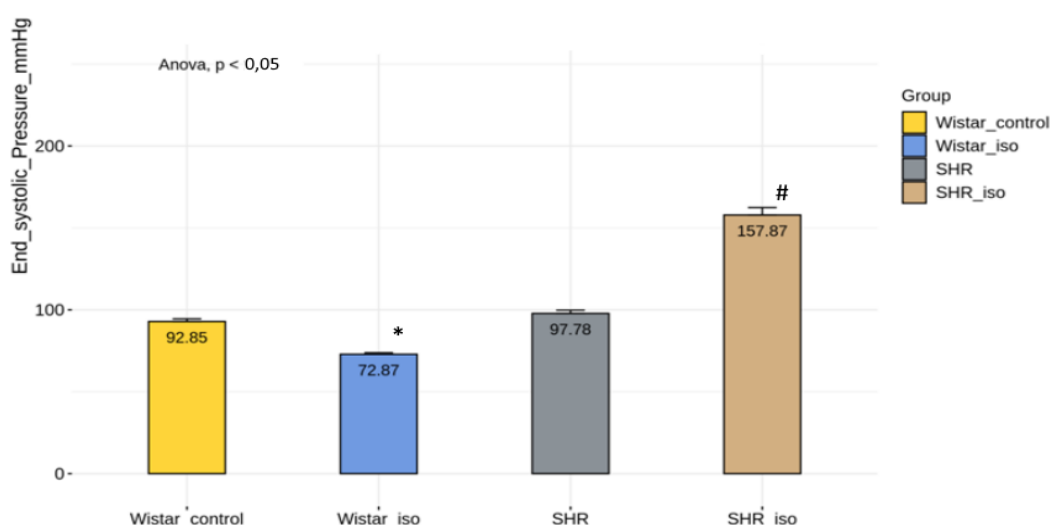


Рис. 3.13. Вплив ІЗО на кінцево-сistolічний тиск у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). *P<0.05 проти Wistar, # P<0.05 проти SHR.

dP/dtmax або максимальна швидкість скорочення в шлуночку є важливим параметром в оцінці ефективності скорочення шлуночка. Він залежить від багатьох факторів, зокрема, перед- та постваантаження, кількість серцевих скорочень, здатність кардіоміоцитів до скорочення. Введення ІЗО супроводжувалось зниженням dP/dtmax у щурів на 12,4% та збільшенням цього показника на 51,3% у щурів SHR. При цьому значення dP/dtmax у щурів SHR було достовірно нижчим порівняно з Wistar на 37,2% (рис. 3.14).

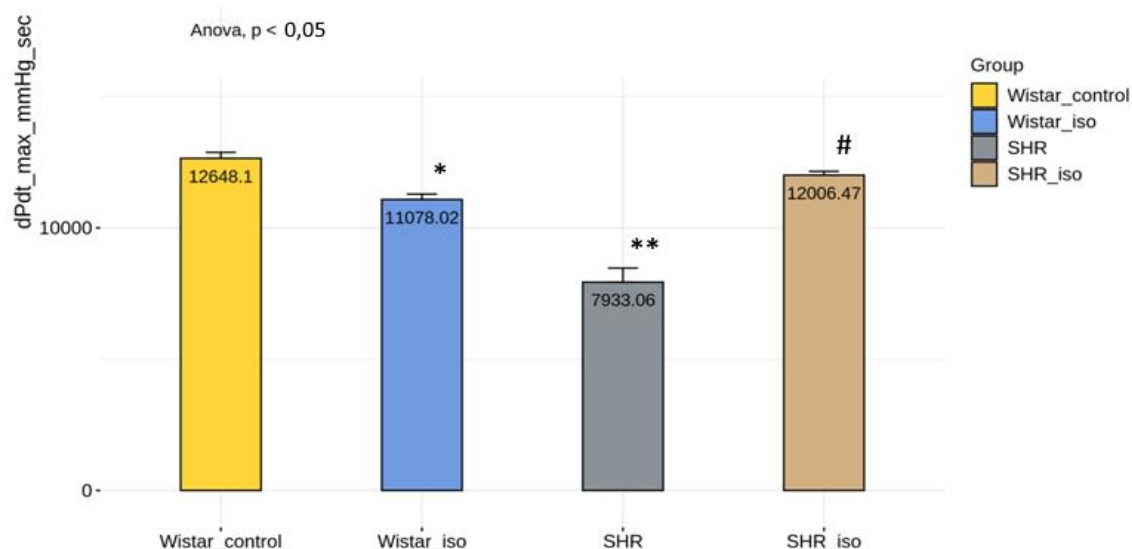
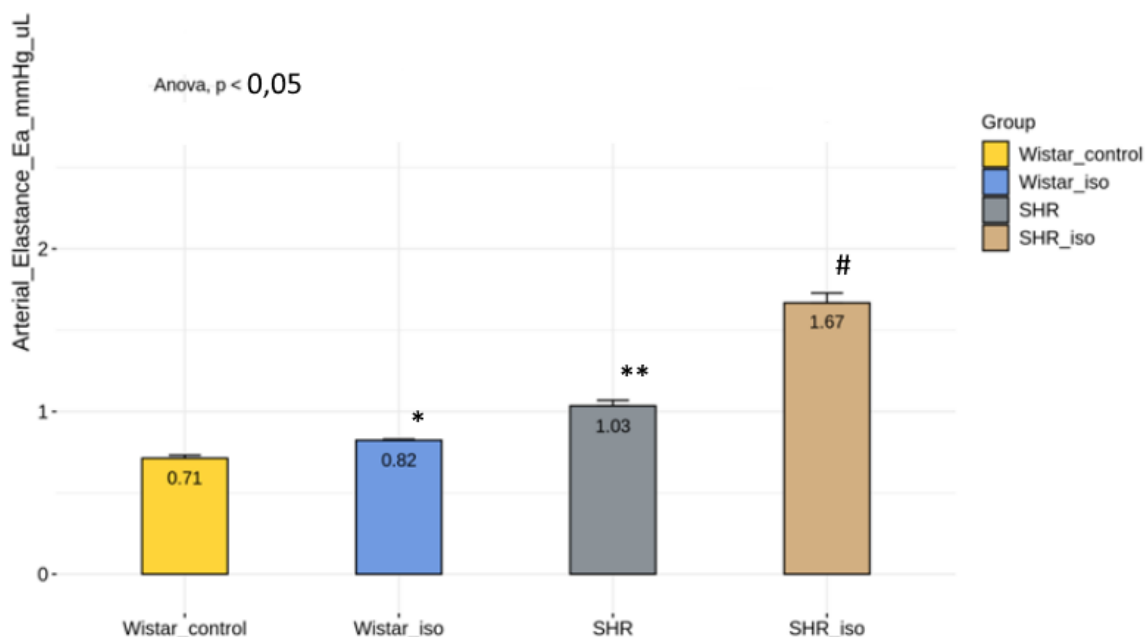


Рис. 3.14. Вплив ІЗО на dP/dtmax у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). **P<0.05 проти Wistar, #P<0.05 проти SHR.

Введення ІЗО, супроводжувалось достовірним збільшенням показника АЕ у щурів SHR на 61%. При цьому варто зазначити, що введення ІЗО щурам лінії Wistar викликало більш помірні зміни цього показника. Також артеріальна жорсткість у SHR була вищою на 45 % ніж у Wistar (рис. 3.15).



n= 9-12 в кожній групі). ** $P < 0.01$ проти Wistar, # $P < 0.05$ проти SHR.

Рис. 3.15. Вплив ІЗО на артеріальну жорсткість у щурів Wistar та SHR (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 (див. узагальнюючу таб. 1 в додатку).

3.3. Морфологічні зміни серця щурів при терміновій та сталій гіпертрофії

Введення ІЗО призводило до значних вогнищевих порушень в міокарді як в групі Wistar, так і в групі SHR, пов'язаних із розвитком некротичного пошкодження (рис. 3.16), зокрема, порушення архітектоніки кардіоміоцитів з контрактурами та лізисом міофіламентів, деструкцією

внутрішніх мембран мітохондрій, активацією лізосомального апарату, накопиченням ліпофусцину, частковим руйнуванням сарколеми аж до вивільнення клітинних органел в міжклітинний простір, що може свідчити про незворотнє ушкодження клітин.

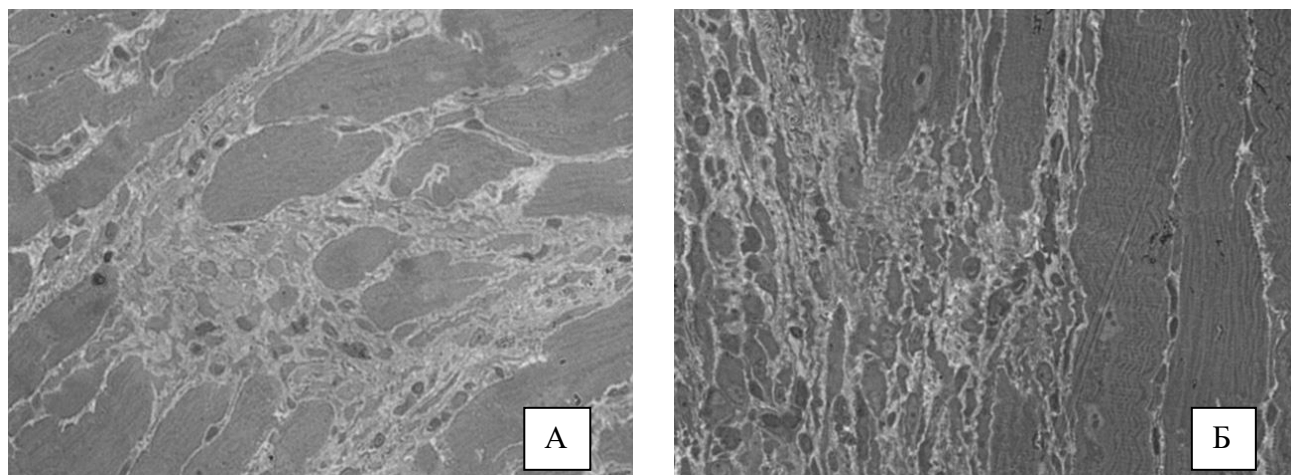


Рис. 3.16. Напівтонкі зрізи міокарду ЛШЛ щурів групи Wistar (А) та групи SHR (Б) після введення ізопротеренолу. Деструкція кардіоміоцитів супроводжується масованим накопиченням елементів сполучної тканини в міжклітинному просторі. Зб. х 40.

В той же час зміни 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 субсаколемального просторі, набряк цистерн саркоплазматичного ретикулума, локальні ураження міофіламентів, наявність великої кількості аутофагічних вакуолей (рис. 3.17, 3.18).

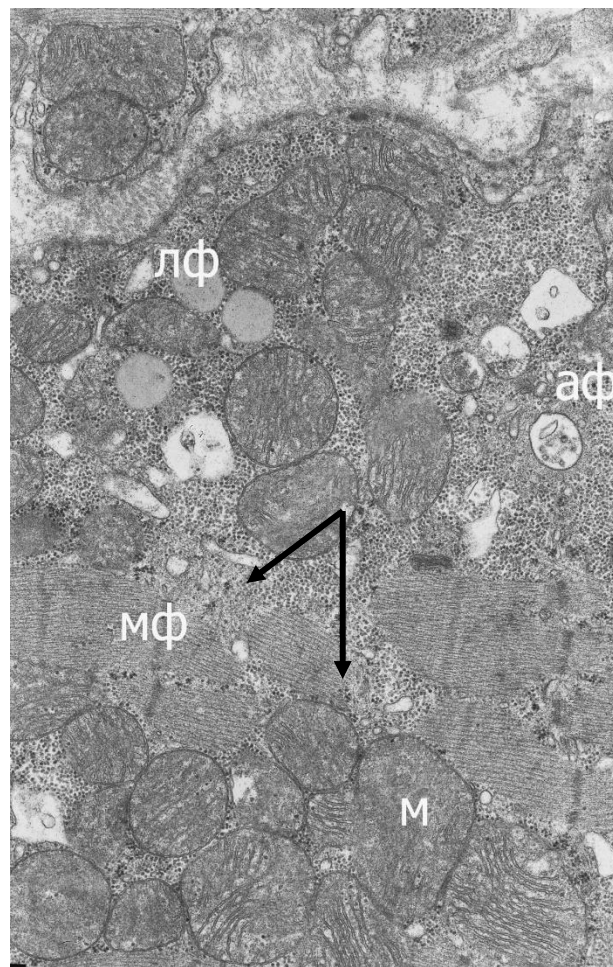
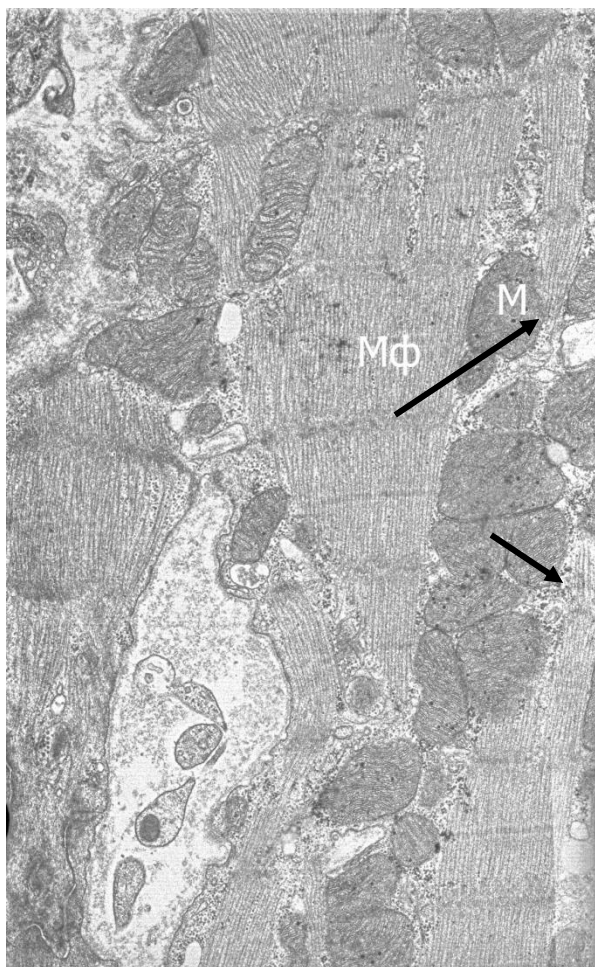


Рис. 3.17. Рис. 3.18.— Міокард ЛШЛ серця щурів групи SHR після введення ІЗО. Лізис міофіламентів (стрілки), накопичення ліпофусцину, Руйнація крист в частині мітохондрій. 3б. х 7200. М - мітохондрія; Мф – міофіламенти; Лф – ліпофусцин; Ав – аутофагічна вакуоля.

Також часто майже не виявляється межа між сарколемою і структурами в міжклітинному просторі у SHR. (рис. 3.19).

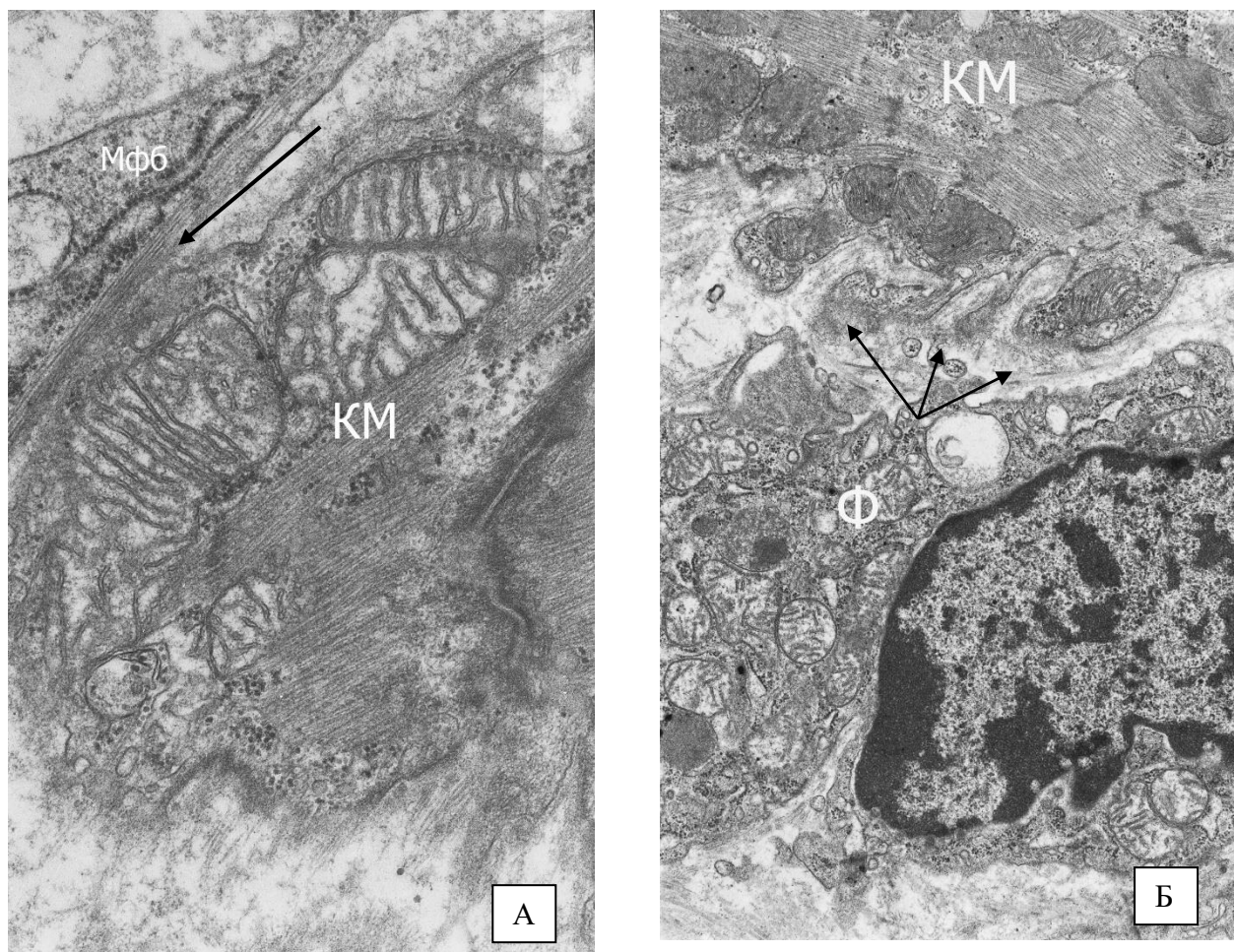


Рис. 3.19.— Міокард ЛШЛ серця групи SHR після введення ізопротеренолу. Ділянки контакта кардіоміоцитів з міофібробластом (А) та фібробластом (Б) стрілками відмічені місця утворення виростів кардіоміоцитом. А - зб. х 14000; Б- зб. х 7200. Мфб - міофібробласт, КМ - кардіоміоцит, Ф - фібробласт.

В групі Wistar після введення ІЗО вогнищево відмічалось порушення архітекtonіки кардіоміоцитів, в більшості пов'язане із вираженим субсарколемальним набряком, лізисом та контрактурами міофіламентів (рис. 3.20, 3.21 А, Б.). Часто контрактири носили генералізований характер, коли ряд кардіоміоцитів, що знаходяться по сусідству містили ділянки перескорочення міофіламентів (див. рис. 3.21 А.Б.). Як і в групі SHR, виявилась активація лізосомального апарату та аутофагії (рис. 3.20).

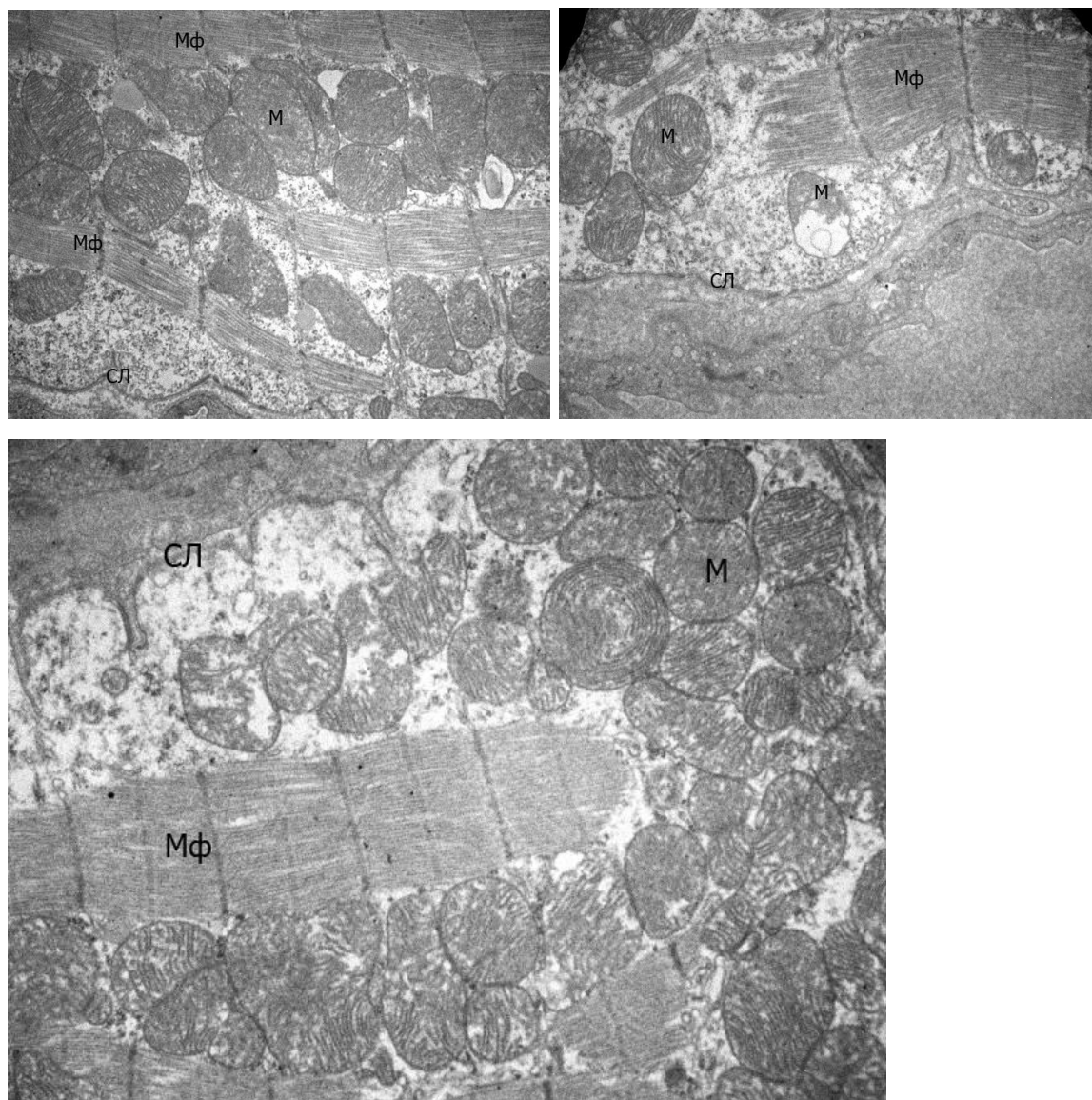


Рисунок 3.20. (А) (Б) (С)– Міокард ЛШЛ серця щурів групи Wistar після введення ІЗО. Набряк цитоплазми в субсарколемальному просторі, лізис міофіламентів, набряк мітохондрій, що часто утворюють скупчення в різних ділянках кардіоміоцита. Зб. х 10000. Мф - міофіламенти, М - мітохондрія; СЛ – сарколема.

Порушення притоку крові до тканин ЛШЛ серця та формування виростів та складок ендотеліоцитів мікросудин в міокарді, що характерно для гіперактивованого ендотелію, може бути причиною такого явища, як майже повна відсутність просвіту в окремих

капілярах піддослідних тварин групи Wistar на фоні введення ізопротеренолу (рис. 3.21.).

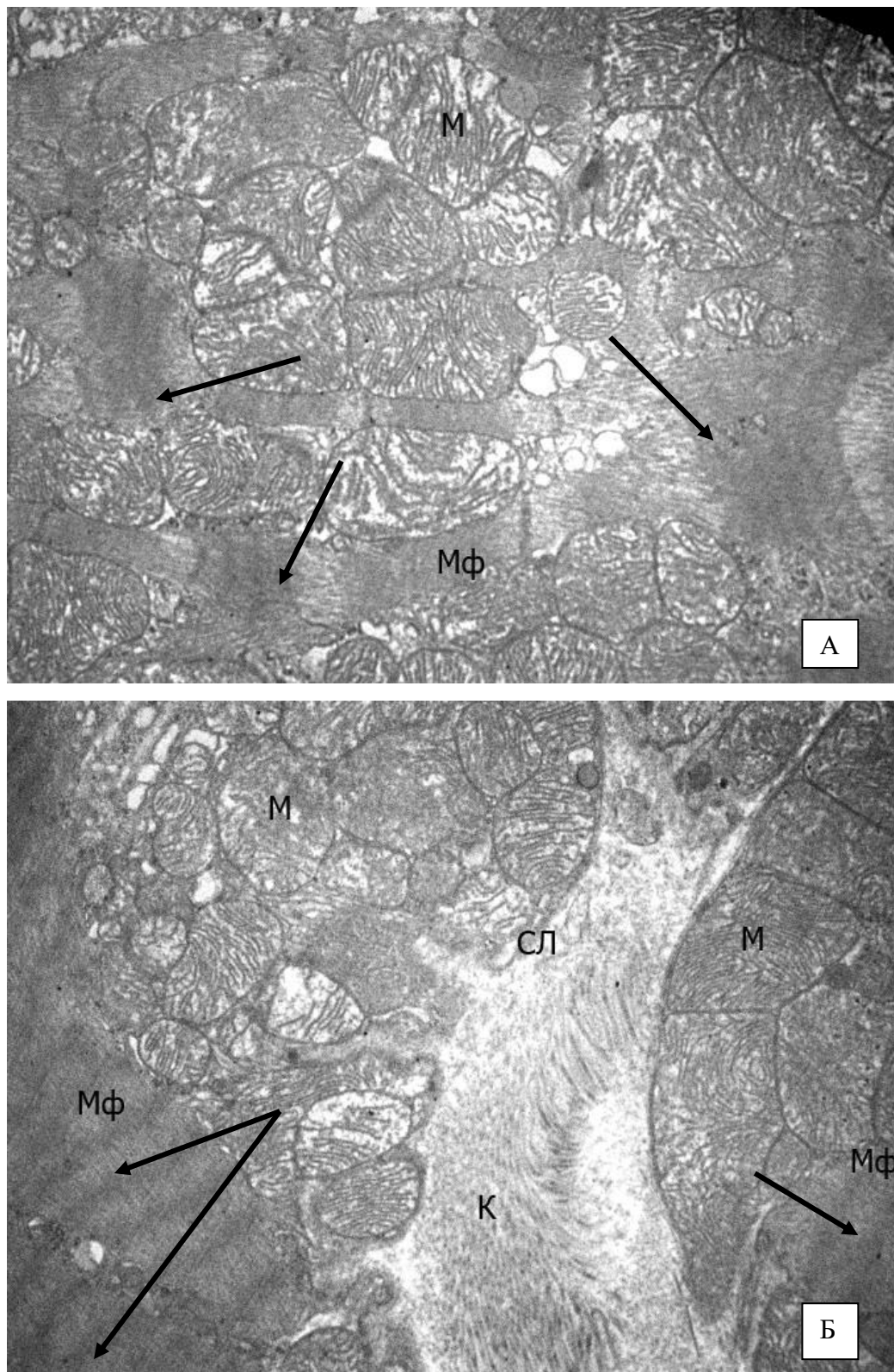


Рис. 3.21. Міокард ЛШЛ серця щурів групи Wistar після введення ІЗО.

Виражені контрактири (стрілки), що охопили міофіламенти в кардіоміоциті (А), та два сусідні кардіоміоцити (Б). Зб. х 7200. Мф - міофіламенти; М - мітохондрія; К - колаген; СЛ - сарколема.

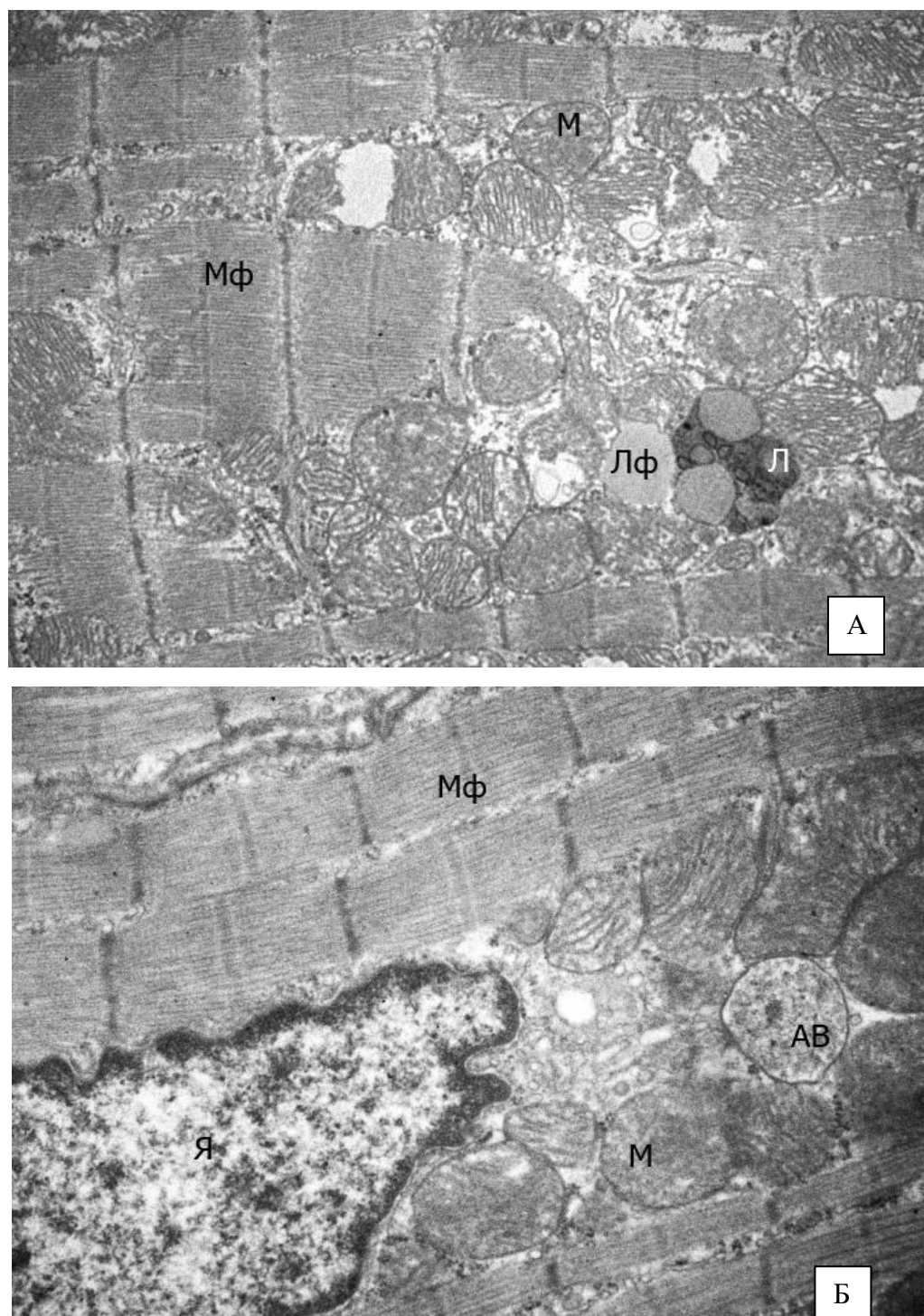


Рис. 3.22. Міокард ЛШЛ серця щурів Wistar після введення ІЗО. А - лізис та руйнація міофіламентів, набряк мітохондрій, накопичення

ліпофусцину в лізосомі та в цитоплазмі клітини. Б - в перинуклеарному просторі накопичення мітохондрій, везикуляція цитоплазми та аутофагосома, що містить дебрис. Зб. х 7200. Мф - міофіламенти; Лф - ліпофусцин; Ав - аутофагічна вакуоля; Л - лізосома; Я - ядро.

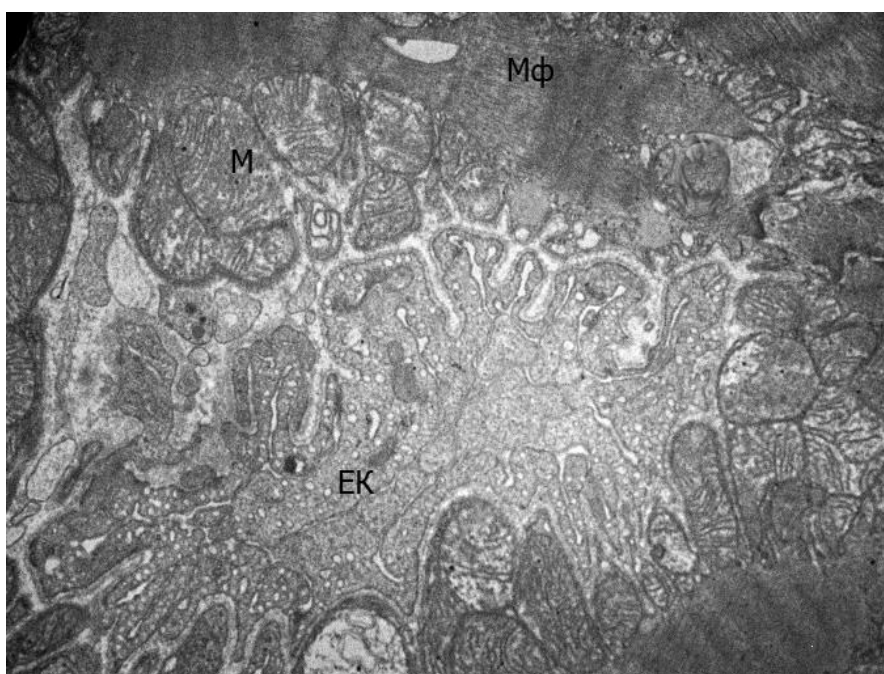
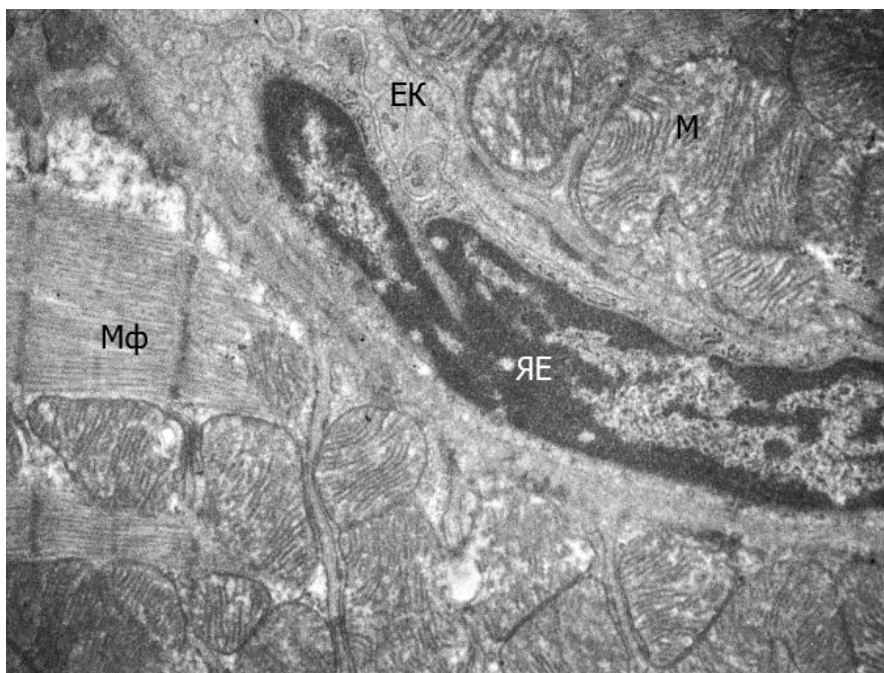


Рисунок 3.23 (А) (Б) – Міокард ЛШЛ серця щурів групи Wistar після

введення ІЗО. М - мітохондрія; Мф - міофіламенти; ЕК - ендотелій капіляра, ЯЕ - ядро ендотеліоцита.

У міокарді як групи Wistar, так і групи SHR на фоні ізопротеренолу виявлялись фрагменти кардіоміоцитів, відокремлені від тіла клітини та зовнішнього середовища мембраною. Ці фрагменти містили мітохондрії, рибосоми, залишки міофіламентів та окремі мембранні структури. Часто в міжклітинному просторі серед клітин сполучної тканини зустрічались фрагменти кардіоміоцитів, обмежені сарколемою з цілком збереженою архітектонікою та структурою органел (рис. 3.24).

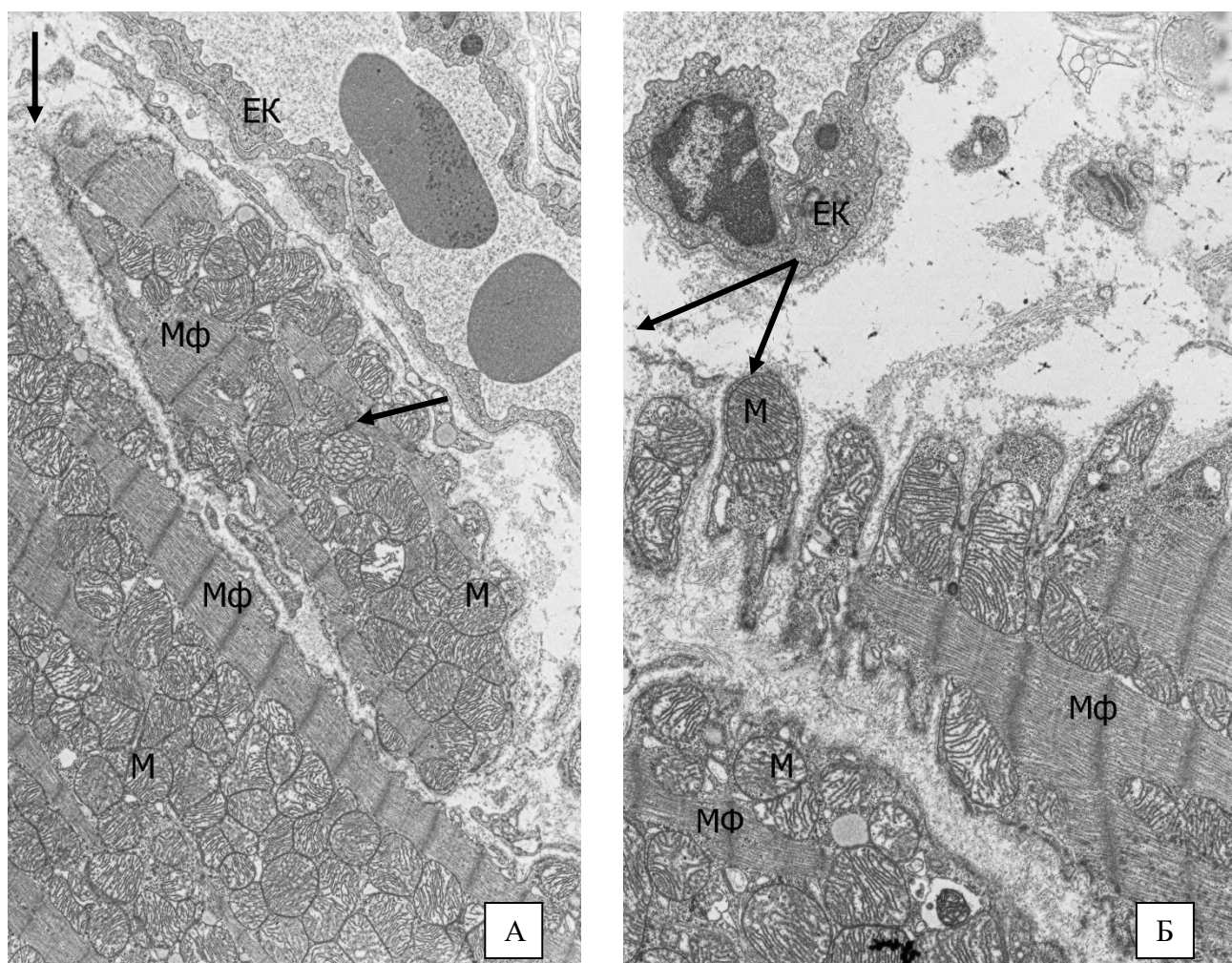


Рис. 3.24. Міокард ЛШЛ серця щурів групи Wistar (А) та SHR (Б) після введення ІЗО. 3б. x7200. М - мітохондрія; Мф - міофіламенти; Лф - ліпофусцин; Ав - аутофагічна вакуоля; ЕК - ендотелій капіляра.

Введення ізопротеренолу шестимісячним щурам ліній Wistar та SHR прискорює ремоделювання серця і в значній мірі також за рахунок загибелі кардіоміоцитів в результаті некротичних, апоптотичних та аутофагічних процесів, що стимулюються адренергічними впливами.

3.4. Зміни експресії структурних, сигнальних та регуляторних білків у шлуночках серця щурів Wistar та SHR в динаміці розвитку гіпертрофії.

Експресія дистрофіну у ЛШЛ серця SHR була значно меншою, ніж у щурів Wistar ($P < 0,05$, див. рис. 3.25). Введення ІЗО дещо підвищувало експресію білка на 3 добу, але після цього спостерігалось прогресивне виснаження рівня білка в шлуночках серця.

Після цього експресія дистрофіну поступово знижувалася, максимальна редукція експресії спостерігалася на 30 добу, показники були у 2,8-3,0 рази меншими від контролю ($P < 0,05$).

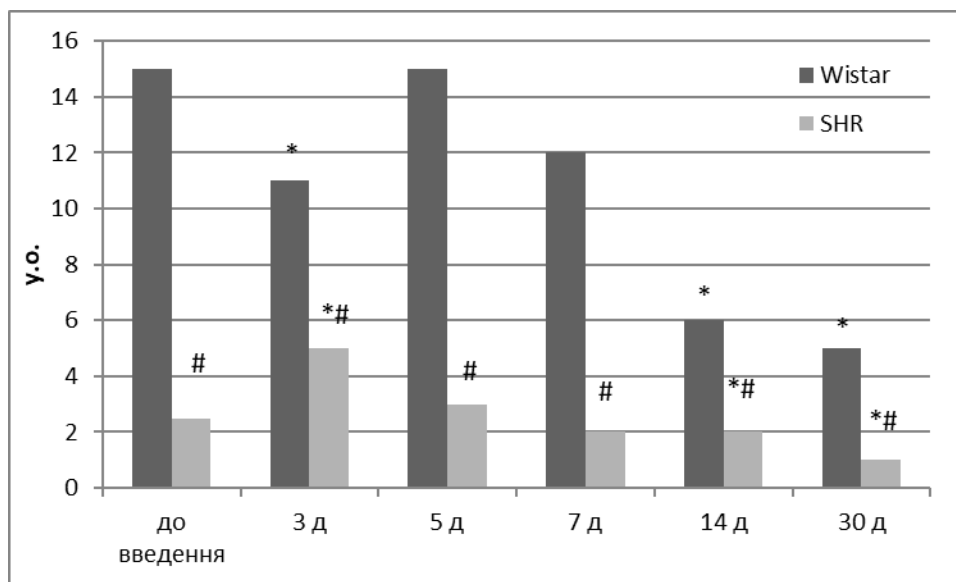


Рис. 3.25. Експресія білка дистрофіну у ЛШЛ серця щурів Wistar та SHR при ізопротеренол-індукованій гіпертрофії. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем, # $P < 0,05$ порівняно з щурами Вістар.

Одержані показники свідчать, що у щурів лінії Вістар адренергічна стимуляція призводить до транзиторного компенсаторного зростання експресії дистрофіну у шлуночках серця протягом 5 діб. В подальшому спостерігається прогресивне зменшення експресії білка дистрофіну у ЛШЛ серця, яка не відновлюється протягом місяця спостережень. Оскільки зменшення експресії дистрофіну супроводжується розвитком серцевої недостатності [15,19], ці зміни можна розглядати як ранній фактор ризику. Одержані показники відповідають морфологічним проявам пошкодження тканини серця і розвитку фіброзу міокарда.

На відміну від щурів лінії Wistar, SHR характеризувалися нестачею експресії дистрофіну в шлуночках серця, що корелює з їх значною летальністю при адренергічній стимуляції. Індукція експресії дистрофіну при експериментальних впливах у цих щурів також була значно порушеною, максимальні показники були у 2-3 раза меншими, ніж у щурів Wistar, а тривалість індукції – значно скороченою, раніше наступало виснаження цієї реакції (на 3 добу).

Таким чином, одержані результати вказують на значну роль дистрофіну у розвитку ремоделювання міокарда при адренергічній стимуляції, роль нестачі цього білка в патогенезі артеріальної гіпертензії та її ускладнень, в тому числі, СН. Експресія дистрофіну може бути раннім проявом ремоделювання міокарда та фактором ризику розвитку СН.

При дослідженні експресії білка SERCA2 виявлено, що цей білок індукувався у міокарді щурів Wistar протягом 5-7-ї доби розвитку ізопротеренол-індукованої гіпертрофії і залишався підвищеним до 14-ї доби (рис. 3.26). В той же час у SHR експресія білка була значно більш високою протягом всього терміну дослідження, і додатково зростала на 5-у добу введення ізопротерену.

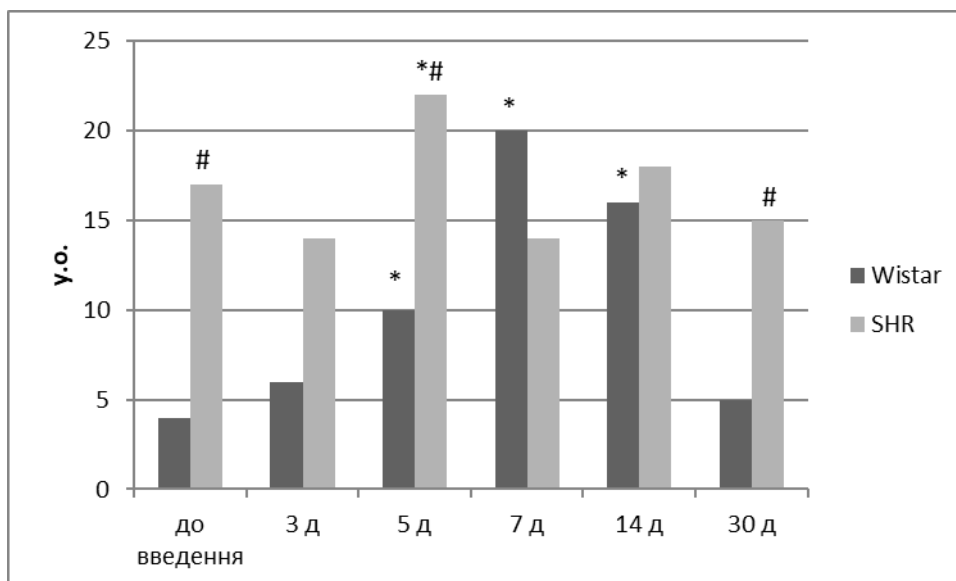


Рис.3.26. Експресія білка SERCA2 у міокарді щурів Wistar та SHR при ізопротеренол-індукованій гіпертрофії. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем, # $P < 0,05$ порівняно з щурами Wistar.

Таким чином, встановлено, що пошкодження міокарда внаслідок адренергічної стимуляції розвивається переважно в ЛШЛ серця, що може бути ланкою наступного розвитку недостатності ЛШЛ. У щурів Wistar ізопротеренол-індукована гіпертрофія супроводжується транзиторною індукцією білка SERCA2, в той час як у SHR рівень експресії цього білка компенсаторно підвищений, але резерв його індукції менш значний.

Для характеристики динаміки розвитку молекулярних механізмів пристосувальних змін міокарда до розвитку гіпертрофії проведено порівняльне дослідження експресії білків, залучених до сигнальних та ефекторних шляхів протекторних і проліферативних механізмів кардіоміоцитів.

Експресія білка HSP60, кофактора рецепторів IGF-1, не відрізнялася в міокарді щурів з наявністю хронічної гіпертрофії та без неї (рис.3.27). Однак у відповідь на прогіпертрофічний стимул експресія цього кофактора зростала тільки у щурів лінії Wistar.

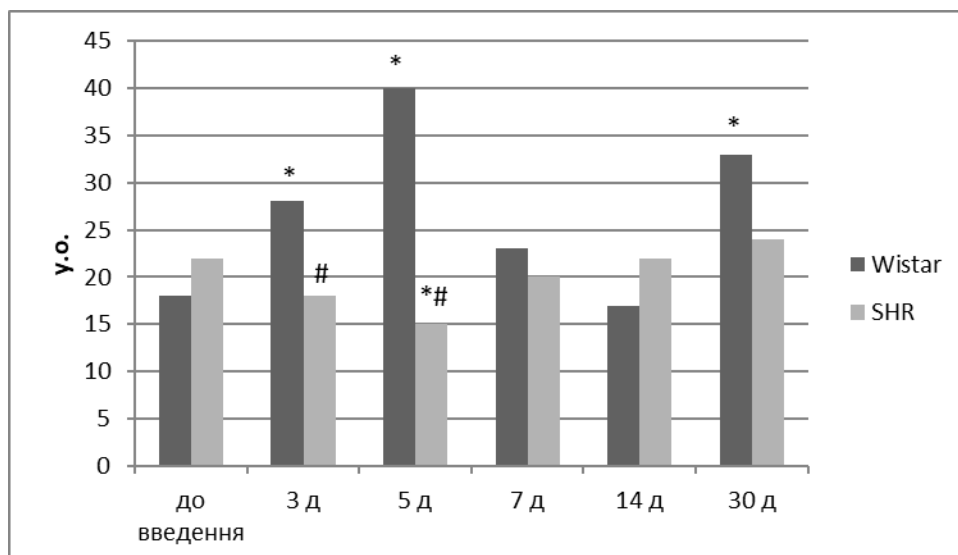


Рис. 3.27. Експресія білка HSP60 у лівому шлуночку серця щурів Wistar та SHR при ізопротеренол-індукованій гіпертрофії. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем, # $P < 0,05$ порівняно з щурами Wistar.

Виявлено, що експресія білка кінрази Akt в міокарді переважала у щурів Wistar і зростала протягом розвитку гіпертрофії (рис.3.23). У SHR, однак, індукції білка не спостерігали, що може вказувати на обмеження Akt-залежних прогіпертрофічних реакцій.

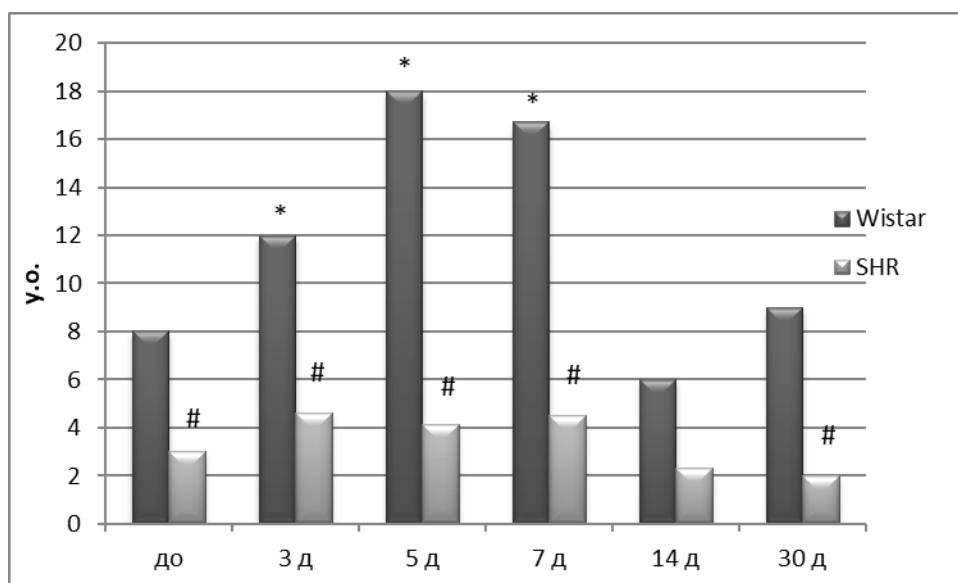


Рис. 3.28. Експресія білка Akt у лівому шлуночку серця щурів Wistar та SHR при ізопротеренол-індукованій гіпертрофії. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем.

Згідно з цими результатами, наявність хронічної 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 сталого функціонування міокарда.

Таким чином, при гострій гіпертрофії проліферативні механізми активувалися в ранні терміни дослідження (3-5доба), потім вони зазнавали обмеження і навіть редукувалися до 30 діб експерименту.

3.5. Зміни експресії IGF1mRNA та білка IGF1 і зміни експресії microRNA1 у шлуночках серця щурів Wistar та SHR в динаміці ізопротеренол-індукованої гіпертрофії.

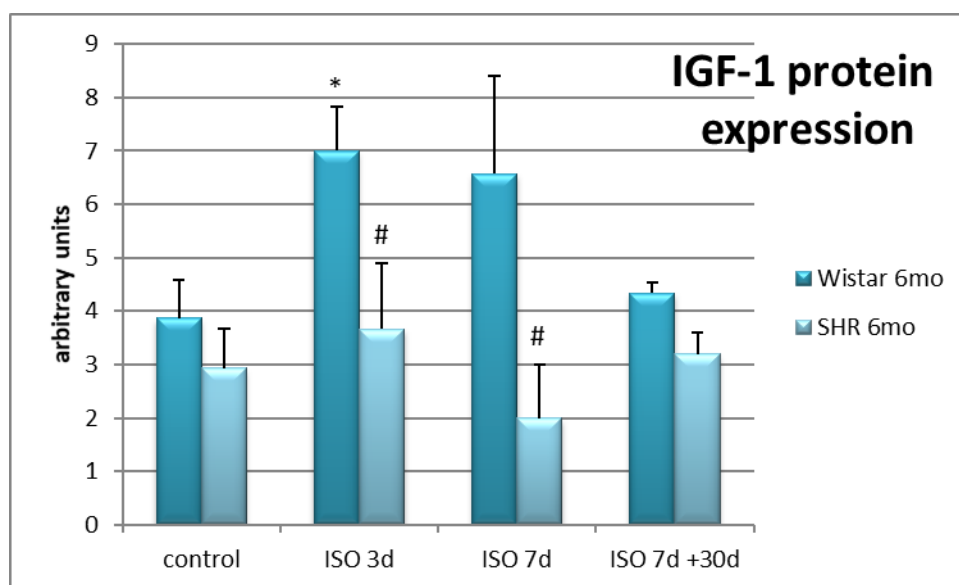


Рис. 3.29. Експресія білка IGF-1 у лівому шлуночку серця щурів Wistar та SHR при ізопротеренол-індукованій гіпертрофії. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем

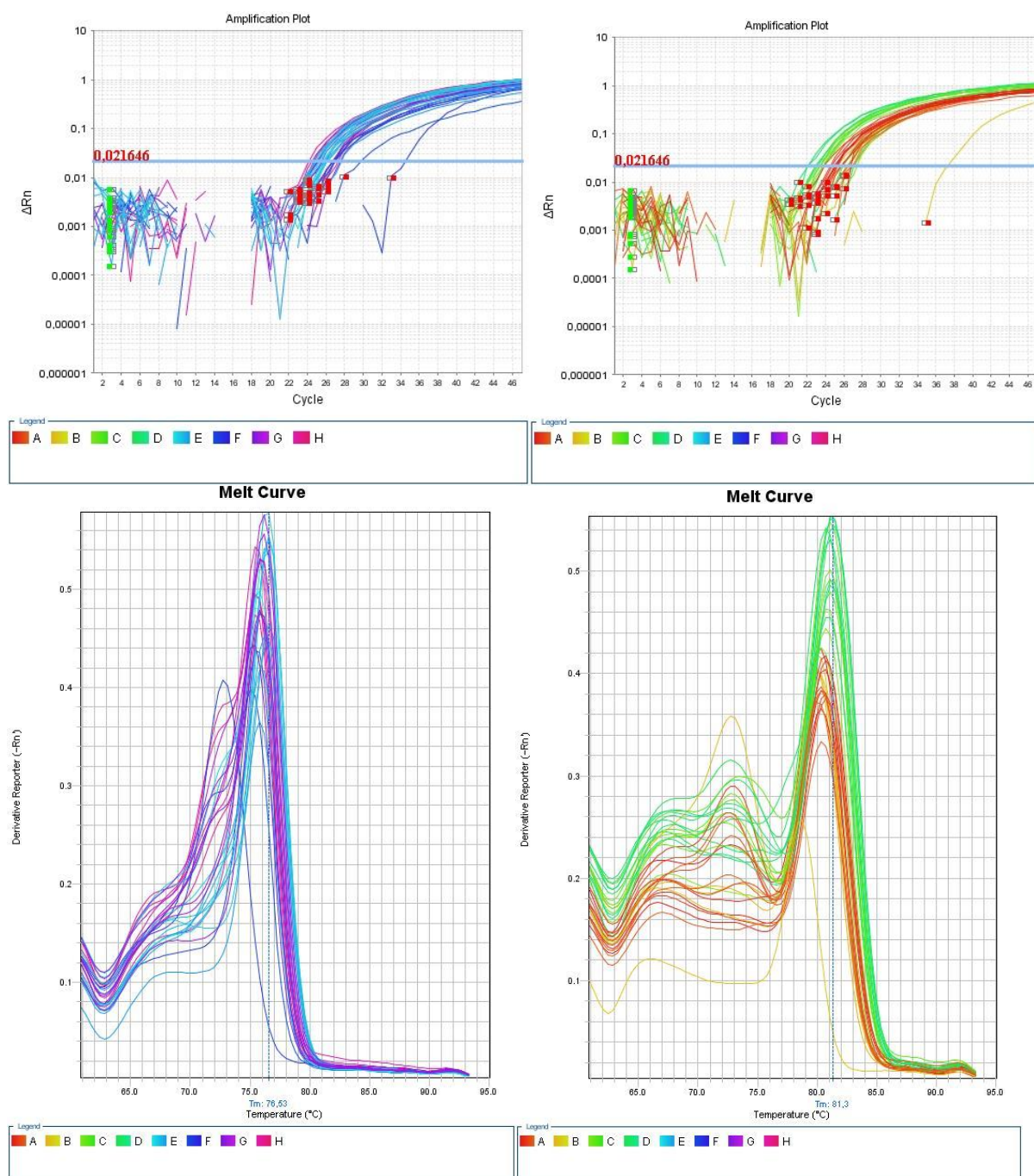


Рис. 3.30.

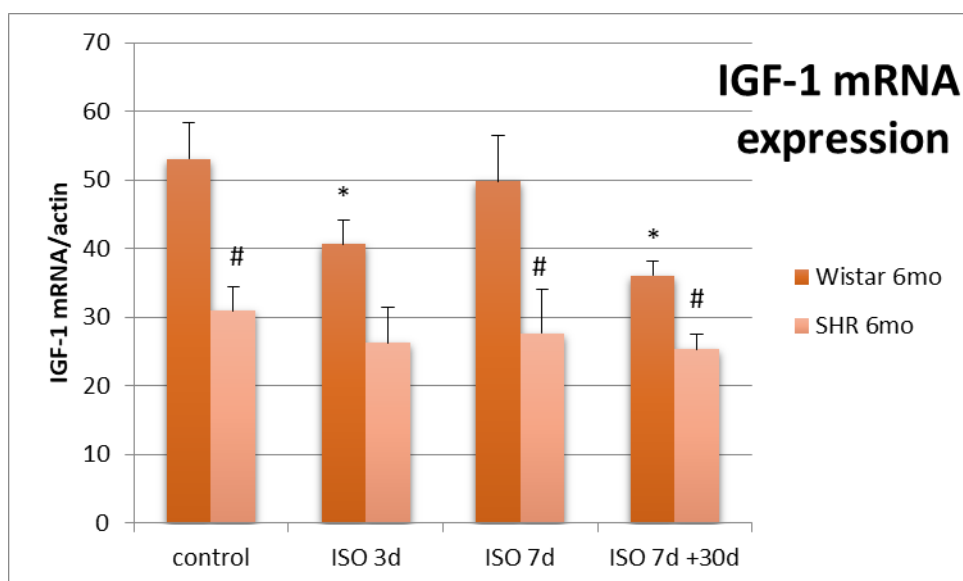


Рис. 3.31. Експресія матричної РНК IGF-1 у лівому шлуночку серця щурів Wistar та SHR при ізопротеренол-індукованій гіпертрофії. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем.

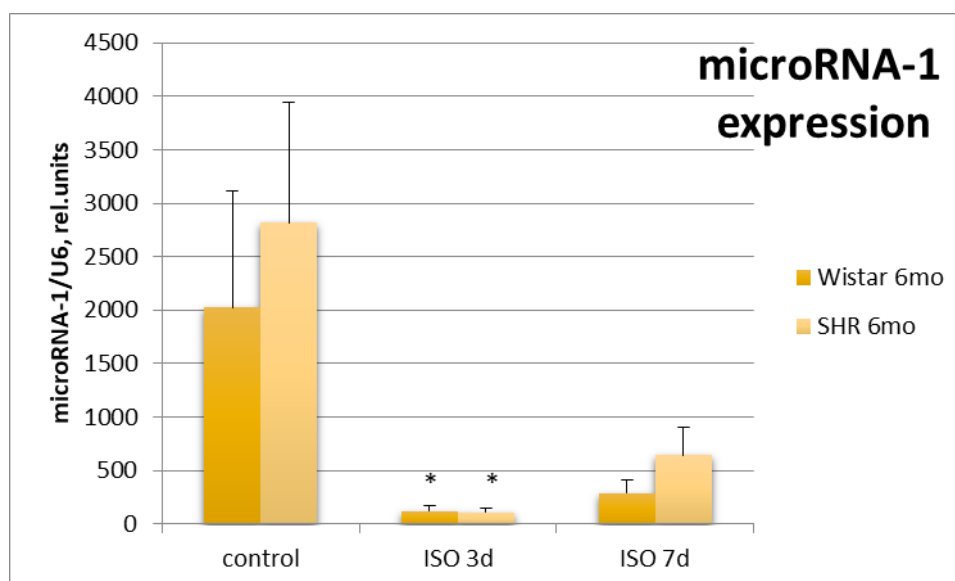


Рис. 3.32. Експресія мікроРНК-1 у лівому шлуночку серця щурів Wistar та SHR при ізопротеренол-індукованій гіпертрофії. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем

РОЗДІЛ 4

ВІКОВІ ПРОЯВИ І МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ГІПЕРТРОФІЇ МІОКАРДА У ЩУРІВ ЛІНІЇ SHR

Дослідження механізмів розвитку гіпертрофії міокарда у старих щурів лінії Wistar і SHR.

В даному розділі представлені дослідження змін кардіогемодинаміки, 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.

4.1. Розвиток гіпертрофії у експериментальних тварин

Для оцінки розвитку гіпертрофії, що розвивалася за умов постнавантаження на серце, що було наслідком сталої артеріальної гіпертензії у щурів лінії SHR18m використовували співвідношення показників маси лівого шлуночка до маси серця, в порівнянні з щурами Wistar.

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; $P=0,001$). Так само як індекс маси правого шлуночка $0,61 \pm 0,03$ та $0,45 \pm 0,04$ щурів ліній SHR та Wistar, відповідно; $P=0,007$. При розрахунку співвідношення між масами лівого і правого шлуночків у щурів лінії SHR був вищим на 15% відсотків ($4,69 \pm 0,44$ та $5,39 \pm 0,52$).

4.2. Кардіогемодинаміка при старінні у щурів WISTAR і SHR.

Гіпертрофія міокарда є складним процесом, що бере свій початок від певного пошкодження серця і може тривати довгий час. Активація деяких ендогенних механізмів складає єдину картину патогенезу та компенсації, при чому вираженість тієї чи іншої ланки буде визначати як

функціональний стан серця та подальший розвиток процесів у гіпертрофованому серці. Розвиток дилатації, структурні та морфологічні зміни все це призводить до послаблення насосної функції серця, порушення його скоротливості. Незважаючи на інтенсивність досліджень змін у роботі серця при впливі такого пошкоджуючого фактора як артеріальна гіпертензія, цей аспект є недостатньо вивченим при старінні.

При гіпертрофії внаслідок впливу артеріальної гіпертензії на серце у щурів SHR спостерігалось зменшення ЧСС на 17%. З віком ЧСС у щурів Wistar, та у щурів SHR – не зазнав істотних змін (рис. 4.1).

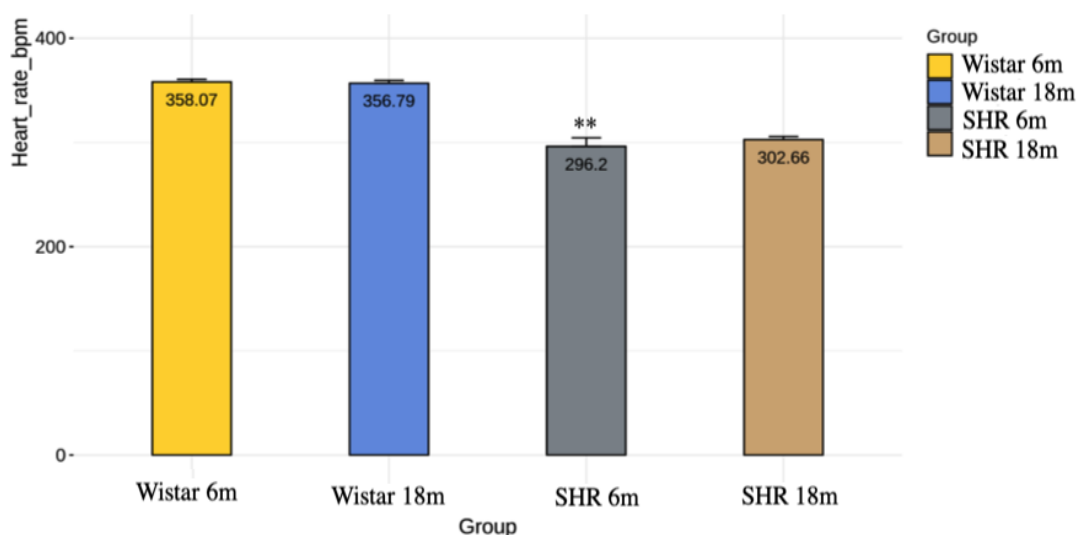


Рис 4.1. Вплив тривалої хронічної гіпертрофії на ЧСС у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). *P<0.05 проти Wistar.

У щурів SHR ФВ була достовірно нижчою на 44,4% порівняно зі щурами Wistar. З віком внаслідок довготривалого впливу артеріальної гіпертензії на серце щурів SHR спостерігалось достовірне зниження ФВ на 28%, так само негативно вік вплинув на фракцію викиду у щурів Wistar на 44% (рис. 4.2).

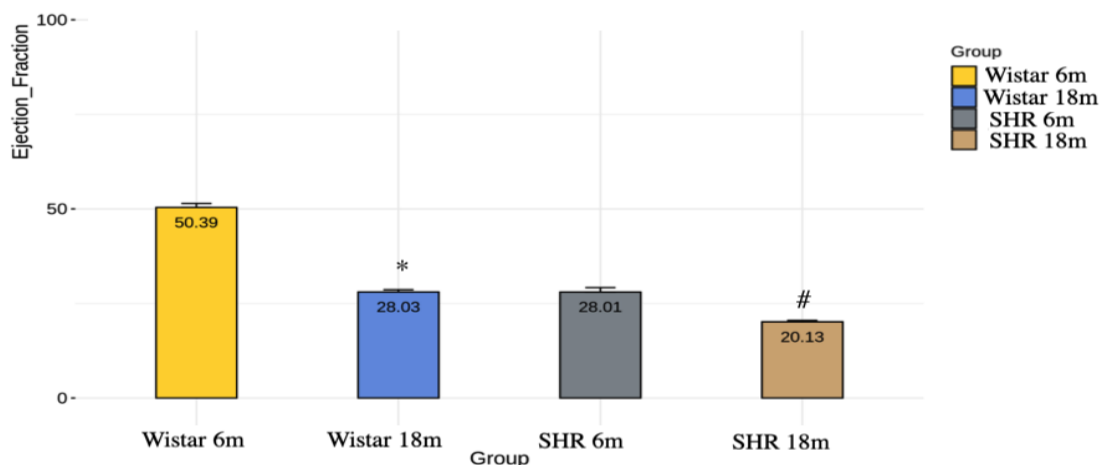


Рис 4.2. Вплив тривалої хронічної гіпертрофії на ЧСС у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). *P<0.05, ** P<0.01 проти Wistar, # P<0.05 проти Wistar.

УО у щурів SHR був достовірно знижений на 30,6% порівняно зі щурами Wistar. Вік та хронічна гіпертрофія достовірно знижувала УО на 28% у щурів SHR, і старіння ніяк не вплинуло на щурів Wistar (рис.4.3).

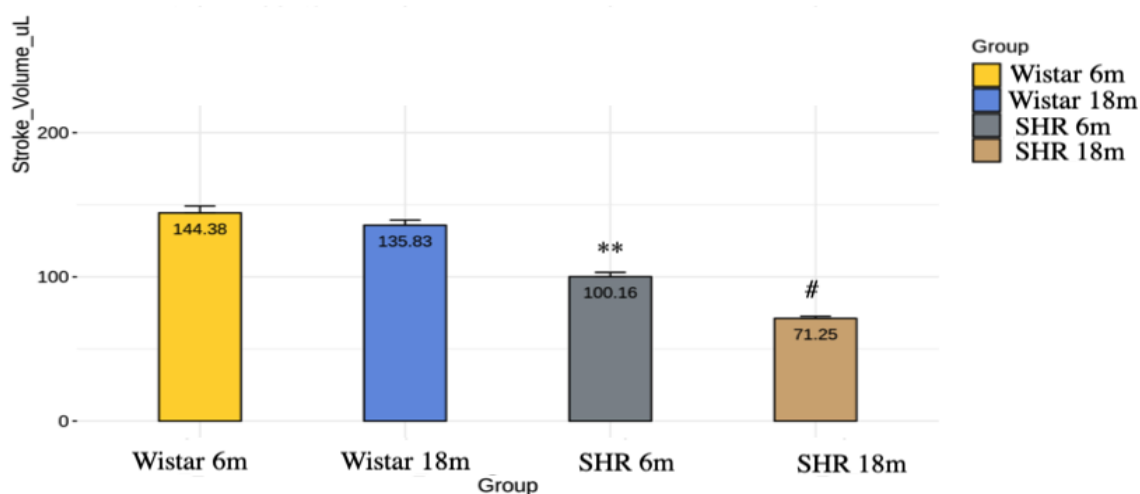


Рис.

4.3. Вплив тривалої хронічної гіпертрофії на ударний об'єм (УО) у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). ** P<0.01 проти Wistar, # P<0.05 проти Wistar.

Ударна робота (УР) – це параметр, що характеризує роботу за одиницю часу, яку виконує лівий шлуночок, щоб здійснити викид крові проти тиску в аорті. В наших досліджах старіння у щурів Wistar супроводжувалось зниженням УР на 18%. На противагу, вік та тривалий вплив артеріальної гіпертензії у щурів SHR не змінив показник SW. При цьому варто зазначити, що УР щурів SHR була на 73,8% нижчою, ніж у щурів Wistar. (рис.4.4)

Вплив віку не супроводжувався змінами ХОК у щурів Wistar, але достовірно зменшувався при впливі артеріальної гіпертензії у старих SHR на 31%. При цьому значення ХОК у щурів SHR було на 39,2% меншим, ніж у щурів Wistar (рис.4.5).

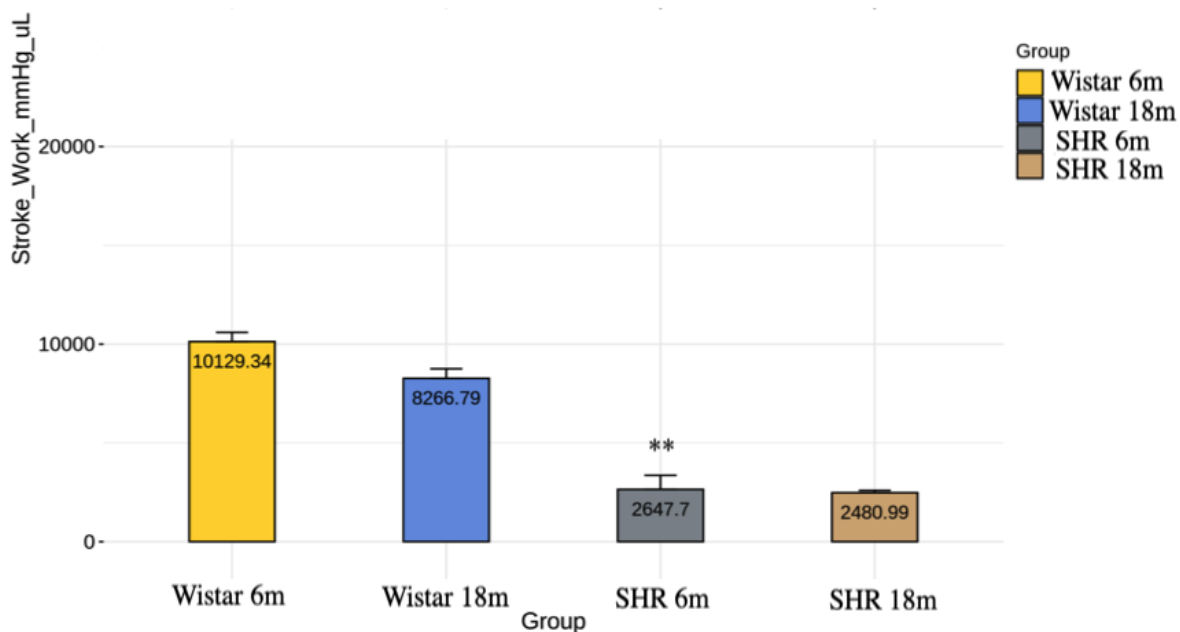


Рис. 4.4. Вплив тривалої хронічної гіпертрофії на ударну роботу у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). *P<0.05, ** P<0.01 проти Wistar.

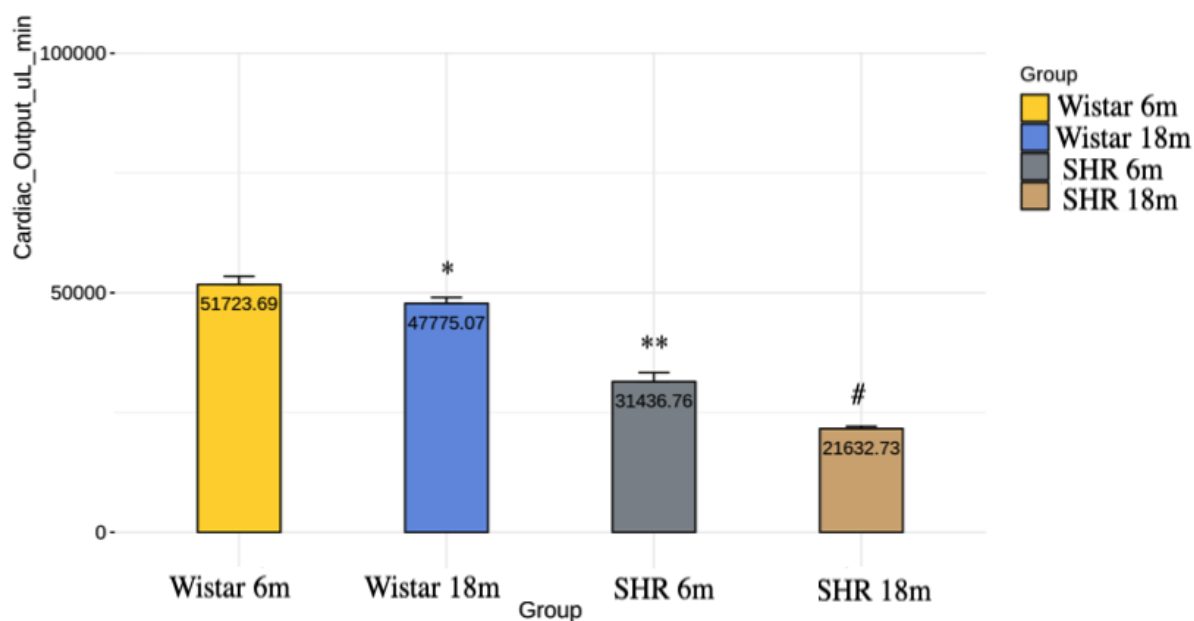


Рис. 4.5. Вплив тривалої хронічної гіпертрофії на хвилинний об'єм крові у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). *P<0.0, **P<0.01 проти Wistar, #P<0.05 проти SHR.

Крім належної кардіоміоцитам здатності до розслаблення, на діастолічну функцію серця впливає також геометрія ЛШ і властивості порожнини ЛШ. Кінцево-діастолічний об'єм (КДО), який характеризує діастолічну функцію, у щурів SHR був достовірно збільшений на 19,8%. З віком кінцево-діастолічний об'єм достовірно збільшувався щурів Wistar на 72%, в той час як у щурів SHR при тривалій хронічній гіпертрофії, індукованій збільшеним постнавантаженням на серце збільшувався лише на 8% (рис. 4.6.).

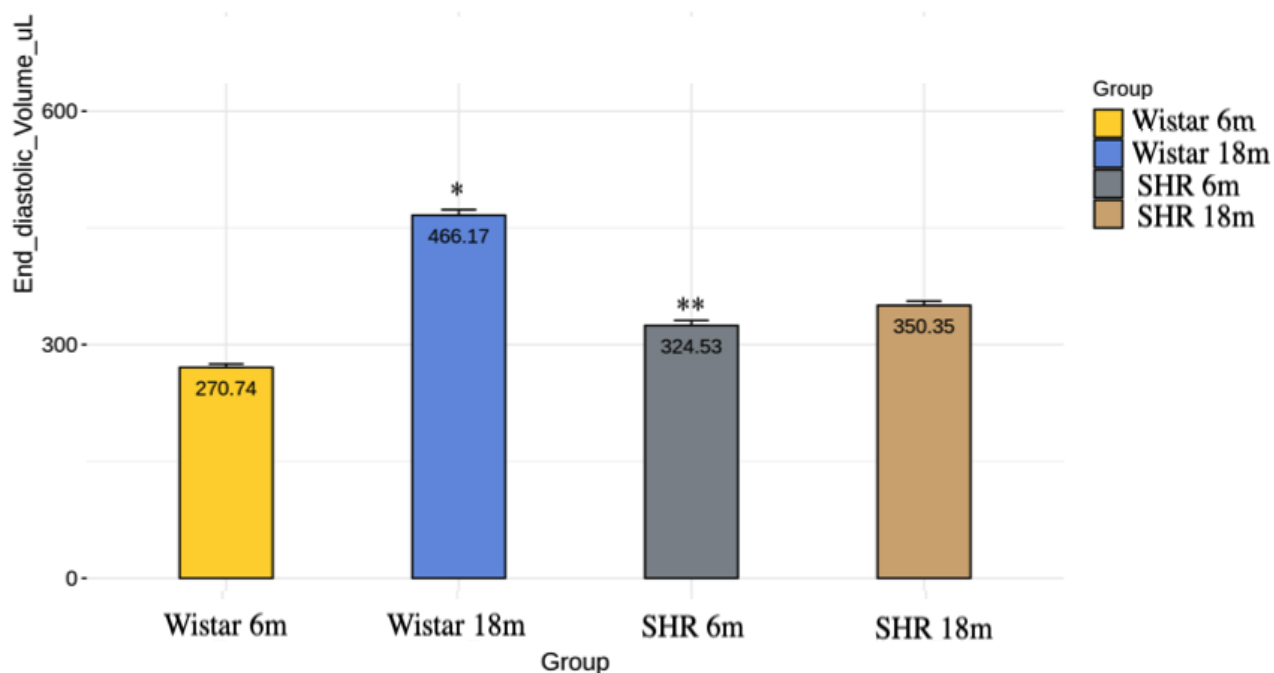


Рис. 4.6. Вплив тривалої хронічної гіпертрофії на кінцево-діастолічний об'єм у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). *P<0.05, **P<0.01 проти Wistar, # P<0.05 проти Wistar.

Кінцево-діастолічний тиск (КДТ) збільшився на 79,5% під дією тривалої хронічної гіпертрофії серця у SHR з віком, а також на 50% у щурів Wistar з віком. Проте у SHR був на 58% нижчим в порівнянні з Wistar (рис.4.7.). Таким чином, оцінка співвідношення КДО/КДТ дозволяє говорити про збільшення кінцево-діастолічної жорсткості порожнини ЛШЛ і відсутність дилатації ЛШЛ. Ці зміни пов'язані зі збільшенням пасивної жорсткості міокарду, яка може бути обумовлена розвитком гіпертрофічних змін міокарда.

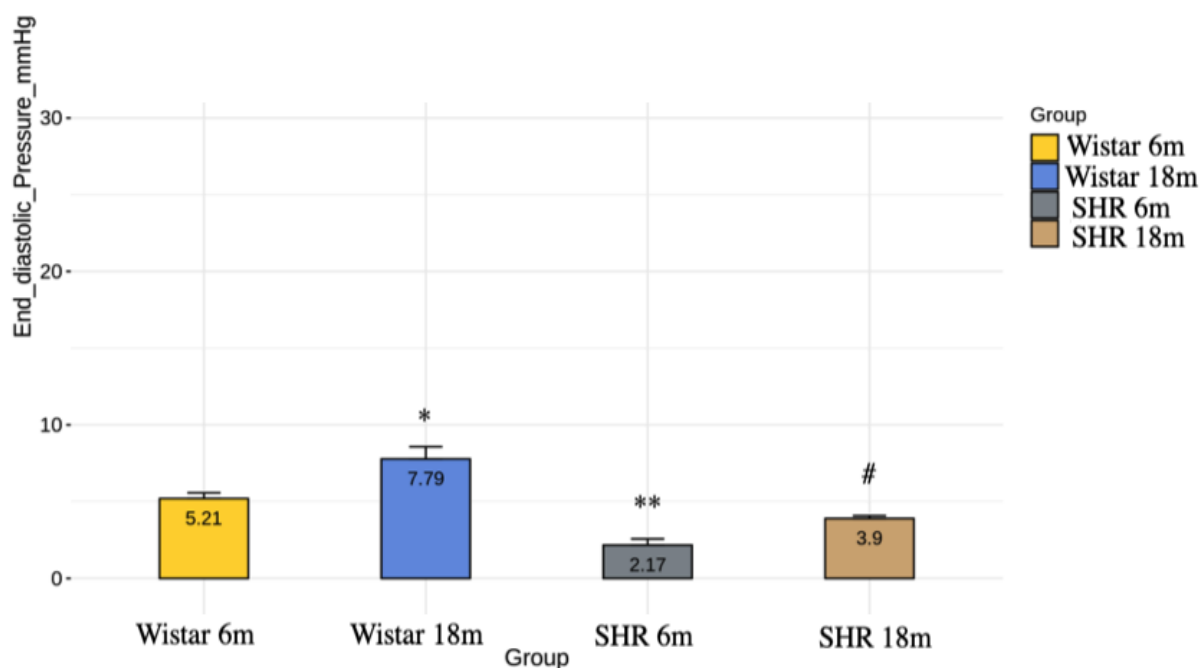


Рис. 4.7. Вплив тривалої хронічної гіпертрофії на кінцево-діастолічний тиск у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). *P<0.05, **P<0.01 проти Wistar, # P<0.05 проти Wistar.

Встановлено, що у щурів максимальна швидкість розслаблення міокарду SHR dp/dt_{min} була збільшена на 17%. Достовірне зменшення величини максимальної швидкості розслаблення міокарду SHR на 44% при впливі довготривалої гіпертрофії та з віком. На противагу, значуще збільшення у старих щурів Wistar на 38% (рис. 4.8.).

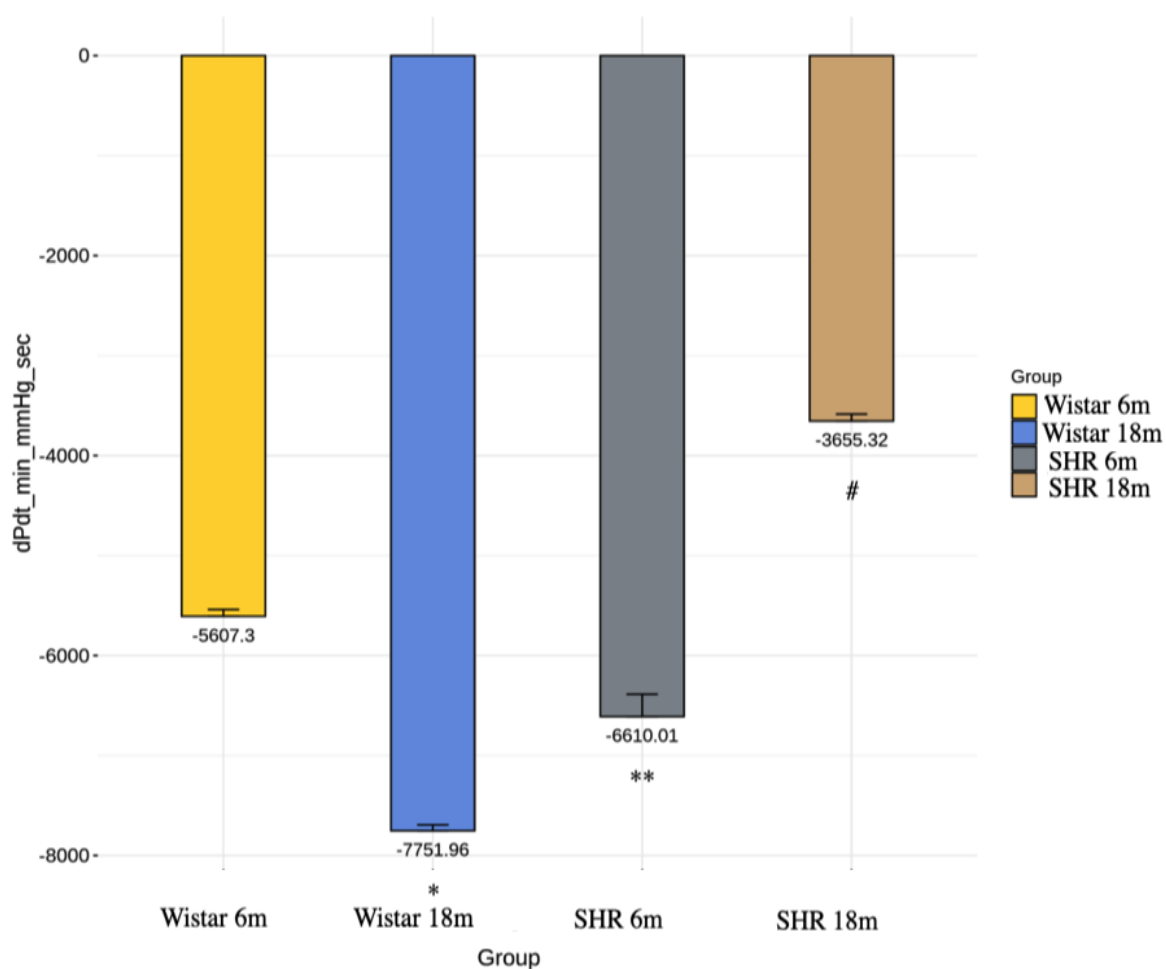


Рис. 4.8. Вплив тривалої хронічної гіпертрофії на швидкість розслаблення лівого шлуночка у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). *P<0.05, ** P<0.01 проти Wistar, # P<0.05 проти Wistar.

Використання індексу – констант тривалості періоду ізovolюмічного розслаблення – τ – дозволило виявити, що у щурів SHR τ w був більшим на 38% в порівнянні з Wistar. З віком також спостерігалось збільшення τ w на 23% у щурів Wistar, в той час цей показник не змінювався у SHR 18м, при тривалому постнавантаженні (рис. 4.9).

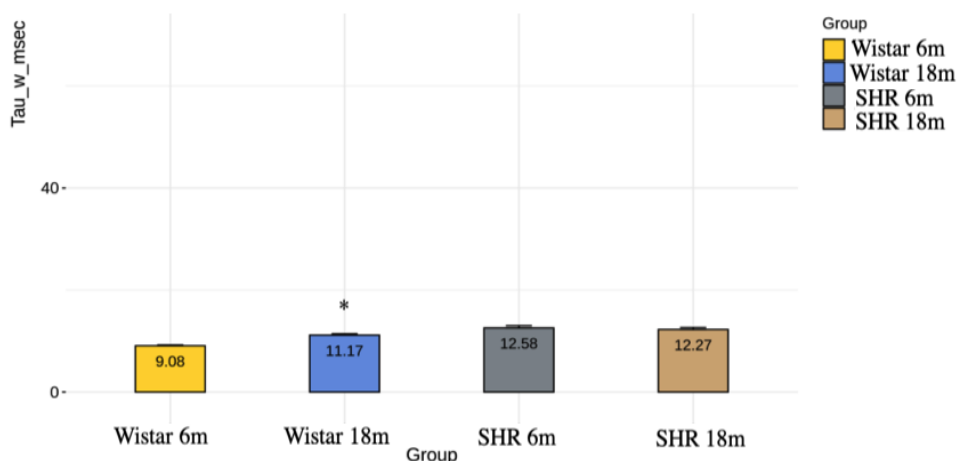


Рис. 4.9. Вплив тривалої хронічної гіпертрофії на ізоволіумічну константу розслаблення лівого шлуночка серця τ_w визначена за методом Вайса у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). **P<0.01 проти Wistar.

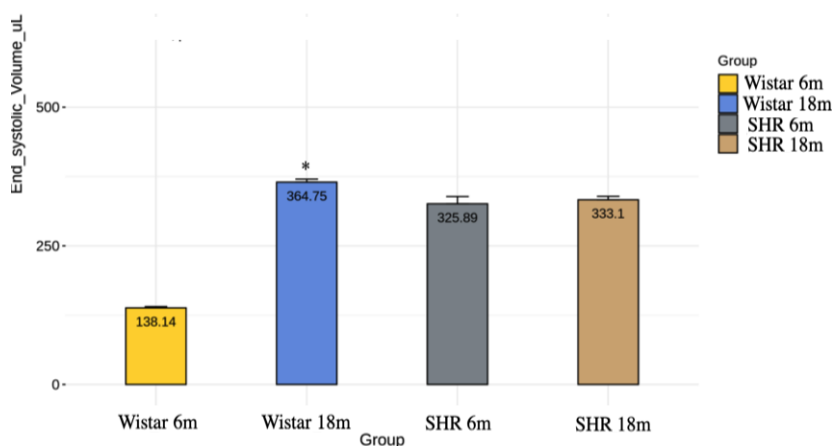


Рис. 4.10. Вплив тривалої хронічної гіпертрофії на кінцево-систолічний об'єм у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). *P<0.05, **P<0.01 проти Wistar.

Кінцево-систолічний об'єм (КСО) є найменшим об'ємом лівого шлуночка, тому він залежить від здатності серця до скорочення та від постнавантаження. Значення КСО було достовірно вищим (на 136%) у

щурів SHR. Вплив віку збільшувало КСО на 164% у щурів Wistar та не змінювало КСО у щурів старих SHR (рис. 4.10).

Кінець фази систолічного скорочення характеризується найвищим тиском у серцевому циклі. Тому кінцево-сistolічний тиск (КСТ) він є залежним від переднавантаження згідно з законом Франка-Старлінга. Ми не виявили відмінностей в значеннях КСТ між щурами ліній Wistar і SHR. Однак, з віком у показник КСТ зростав на 33% у щурів Wistar, і знижувався на 20% у щурів SHR (рис. 4.11).

dP/dt_{max} або максимальна швидкість скорочення в шлуночку є важливим параметром в оцінці ефективності скорочення шлуночка. Значення dP/dt_{max} у щурів SHR було достовірно нижчим порівняно з Wistar на 37,2%. Старіння з одночасним, довготривалим впливом гіпертензії супроводжувалось зниженням dP/dt_{max} у щурів SHR на 53%, в той час як вік не мав жодного впливу на цей показник у Wistar (рис. 4.12).

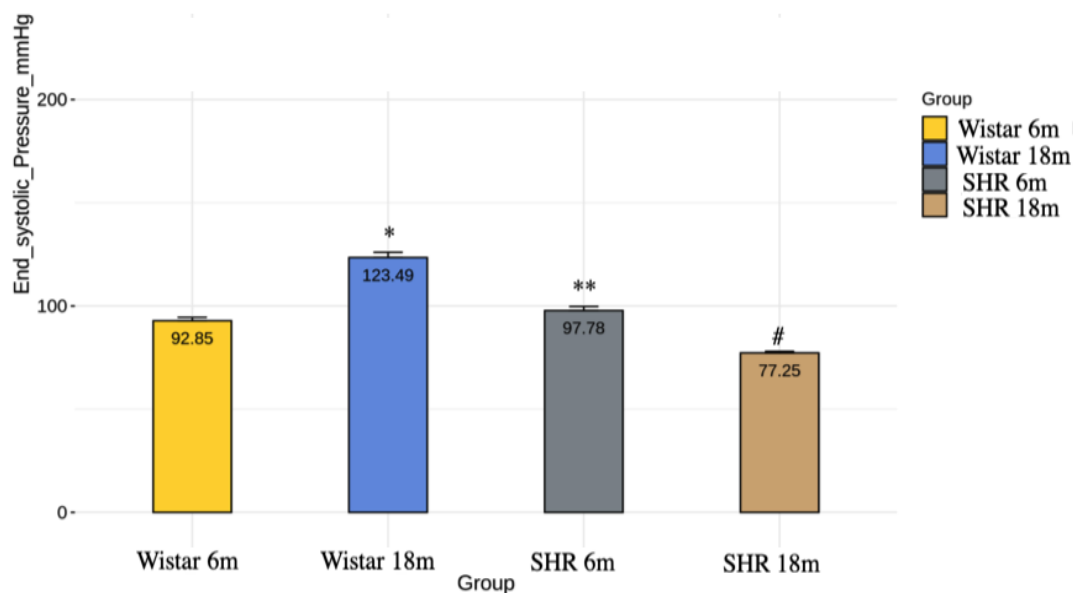


Рис. 4.11. Вплив тривалої хронічної гіпертрофії на кінцево-сistolічний тиск у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ проти Wistar, # $P<0.05$ проти Wistar.

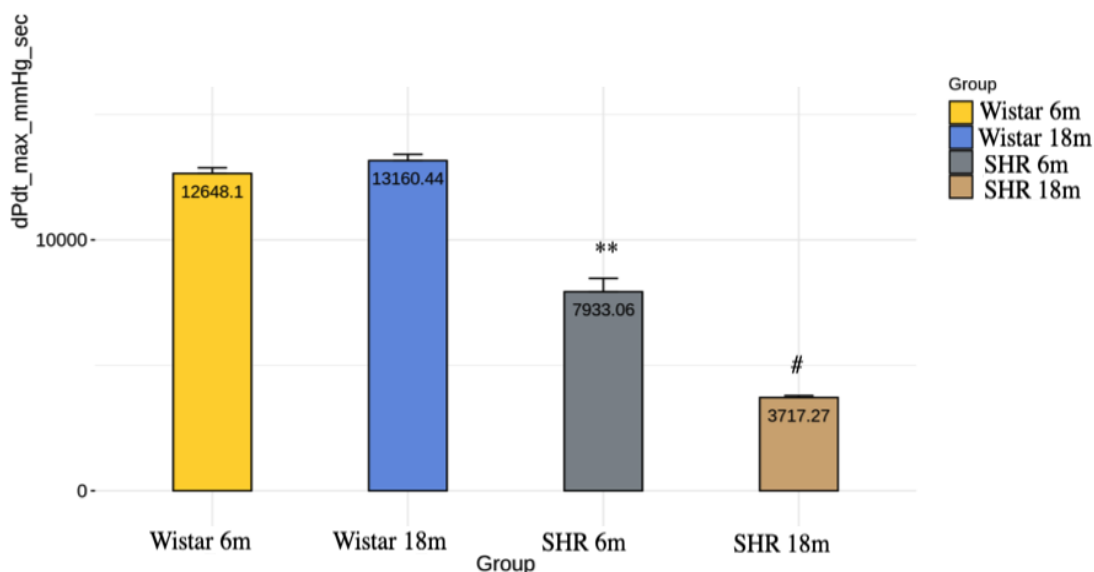


Рис. 4.12. Вплив тривалої хронічної гіпертрофії на dP/dt_{max} у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). ** $P<0.05$ проти Wistar, # $P<0.05$ проти SHR.

Пошкодження серця різного генезу призводить до системної реакції організму і викликає зміни не тільки в структурі тканини серцевого м'язу, але й впливає на стан судин. Застосувавши методику аналізу кривих залежності тиску та об'єму ЛШЛ дозволило нам описати не тільки насосну та діастолічну функцію серця, його скоротливість, а й оцінити співвідношення між параметрами роботи серця та станом судинного русла, що визначає серцевий викид та тиск ЛШЛ, а також енергетичні витрати на роботу серця.

Показник артеріальної жорсткості у щурів Wistar був на 45% нижчим, ніж у SHR. Старіння у групі щурів Wistar супроводжувалось достовірним збільшенням показника АЕ на 73,7%, в той час як у групі SHR АЕ збільшилась лише на 22% (рис. 4.13).

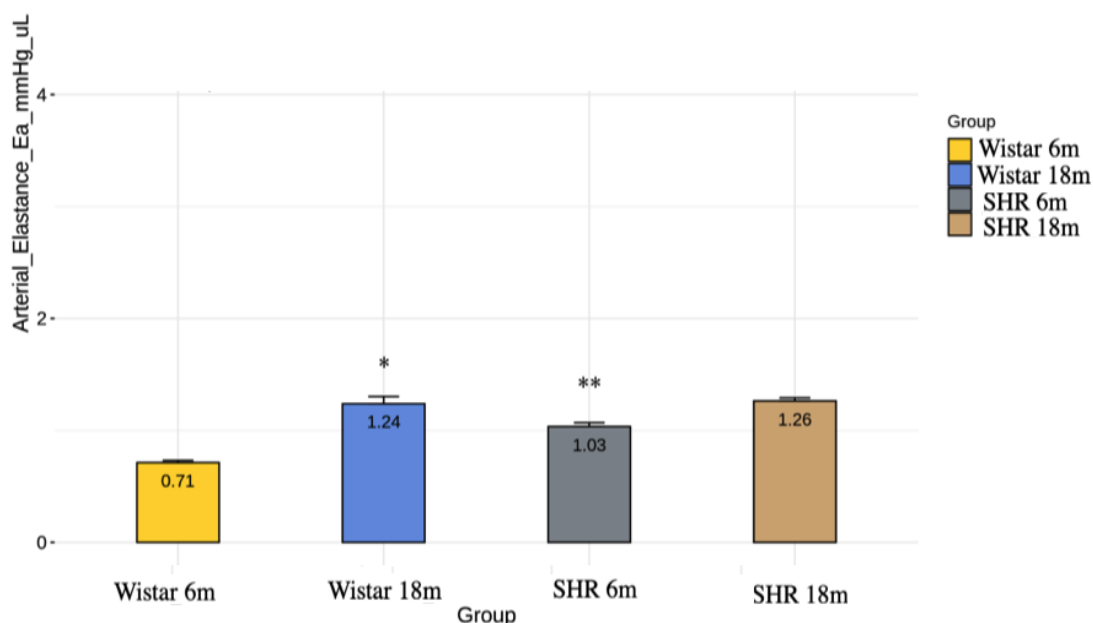


Рис. 4.13. Вплив тривалої хронічної гіпертрофії на артеріальну жорсткість у щурів Wistar та SHR (n= 9-12 в кожній групі). *P<0.05 проти Wistar, **P<0.05 проти Wistar.

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, насосної та діастолічної дисфункції. Разом із тим, у щурів лінії SHR виявляється адаптивний ангіогенез, що забезпечує посилення кровопостачання міокарда (див.узагальнюючу таб.2. у додатку). Дослідження ремоделювання міокарда у щурів SHR передстаречого віку може бути використано в подальшому як модель початкової стадії розвитку серцевої недостатності при артеріальній гіпертензії.

4.3. Морфологічні зміни серця щурів лінії SHR віком 18м при тривалій гіпертрофії, індукованій збільшеним постнавантаженням на серце, у порівнянні з щурами лінії Wistar.

Проведено дослідження патологічних змін структури і функції серця, що були наслідком хронічної артеріальної гіпертензії, у щурів лінії SHR та щурів лінії Wistar, передстаречого віку. Встановлено, що щури лінії SHR характеризуються вираженими морфологічними, що вказують на розвиток перших стадій патологічного ремоделювання з гіпертрофією, фіброзом міокарда, а також насосною та діастолічною дисфункцією, проте виявляється адаптивний ангіогенез, що забезпечує посилення кровопостачання міокарда. Це дає можливість у перспективі використовувати щурів передстаречого віку лінії SHR з ознаками ремоделювання міокарда як модель початкової стадії розвитку серцевої недостатності при артеріальній гіпертензії. Такі дані можуть мати практичне застосування й у майбутніх дослідженнях слугувати розробці профілактичних заходів щодо даної патології.

З віком в серці лінії SHR розвивався значний фіброз, який становив 18,1% від площі лівого шлуночка в порівнянні з 1,8% у щурів лінії Wistar ($P < 0,05$) та локалізувався переважно в області ендокарду. Ультраструктурні дослідження підтвердили розвиток фібротичних змін в тканинах серця в обох дослідних групах, на це вказувала наявність локальних масивів колагенових волокон, фіброцитів та фібробластів в міжклітинному та перикапілярному просторі. Цитоплазма цих клітин була заповнена мембранами гранулярної ендоплазматичної сітки з різко розширеними каналцями з помірно електроннощільним вмістом (рис.4.14). Необхідно відмітити значно більшу кількість проявів активації клітин сполучної тканини та більші розміри зон, наповнених ними, в міокарді лівого шлуночка групи SHR. Як в одній, так і в другій групі

тварин виявлялась гіпертрофія кардіоміоцитів із значними змінами архітекτονіки клітин. Зокрема, в групі Wistar ядра часто зміщувались на периферію клітин, мали значний набряк і містили вздовж внутрішньої ядерної мембрани конденсований хроматин (рис. 4.14.А). В субсарколемальну область зміщувався і апарат Гольджі (рис. 4.14. Б).

Мітохондрії, розміри яких в значній мірі різнилися, знаходились в різних стадіях пошкодження (внутрішні мембрани деформовані, простір між кристами розширений, в окремих клітинах виражений набряк мітохондрій з вакуолізацією та повною деструкцією внутрішніх мембран), втрачали міжмітохондріальні зв'язки і характерну міжфібрилярну ланцюгову орієнтацію та скупчувались в субсарколемальній (група Wistar, рис. 4.15) або в перинуклеарній зоні (група SHR, рис. 4.16). Загальними для обох груп проявами були вогнищеві зміни скорочувальної системи міокарду. Локально виявлялись ділянки лізису та перескорочення міофіламентів. В окремих клітинах спостерігалася втрата орієнтації міофіламентів в просторі (dysarray) (рис.4.17 А,Б). В групі Wistar більшість кардіоміоцитів характеризувались вираженим набряком цитоплазми і практичною відсутністю глікогена, що могло свідчити про більш виражені у порівнянні з групою SHR прояви гіпоксії. Можливо, це було пов'язано з меншою капіляризацією міокарду у щурів Wistar, при цьому частина з наявних капілярів були заповнені тромбоцитами (рис.4.18). В більшості кардіоміоцитів обох груп сарколема зберігала свою цілісність, проте характерний для групи Wistar набряк цитоплазми та деструктивні зміни в клітинах (контрактури та лізис міофіламентів, набряк та масове руйнування мітохондрій) вказували на можливий розвиток некротичних змін, в тому числі вірогідні дефекти цитоплазматичної мембрани. Необхідно відмітити активацію лізосомального апарату в обох дослідних групах. Кардіоміоцити містили багато лізосом в різних станах (як

первинних, так і вторинних), а також аутофагічні вакуолі, наповнені дебрисом і навіть цитоплазматичними органелами (рис.4.19).

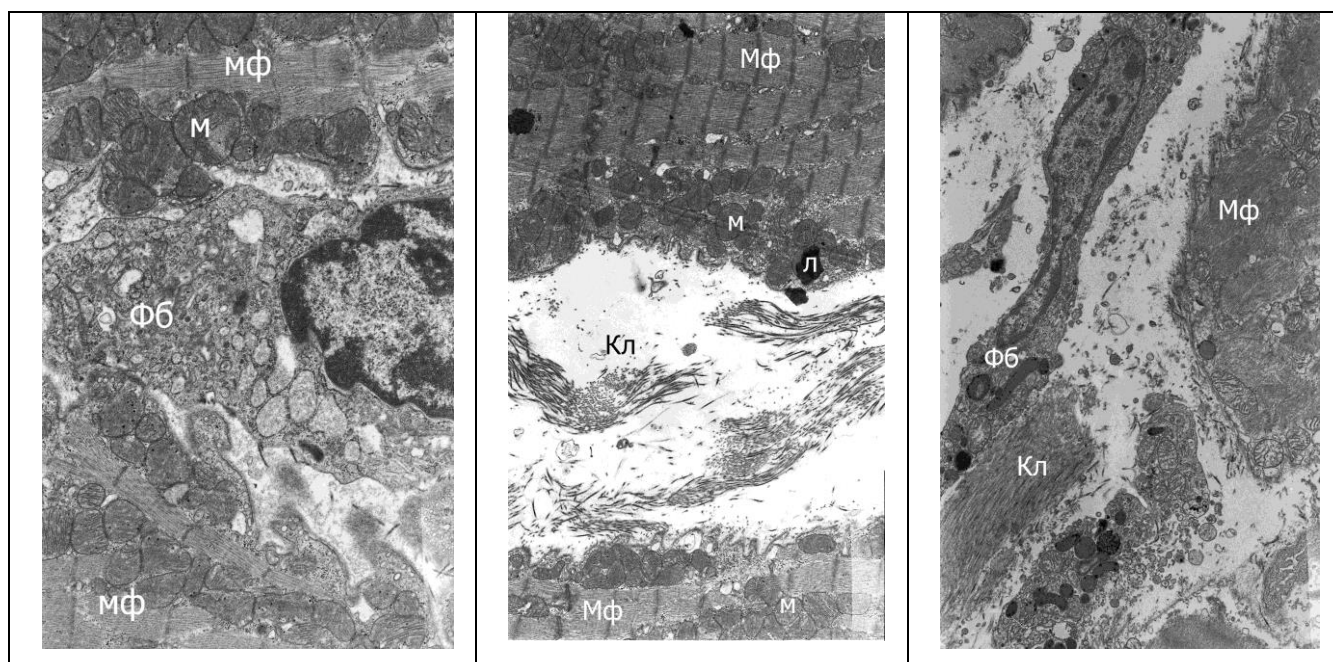


Рис.4.14 А x5800, Б x3600 - міокард щура лінії Wistar, В - міокард щура лінії SHR x3600. Наявність фіброblastів в міжклітинному просторі та великої кількості колагенових включень. Мф.-міофіламенти, М.-мітохондрії, Фб.- фіброblast, Кл.- колаген.

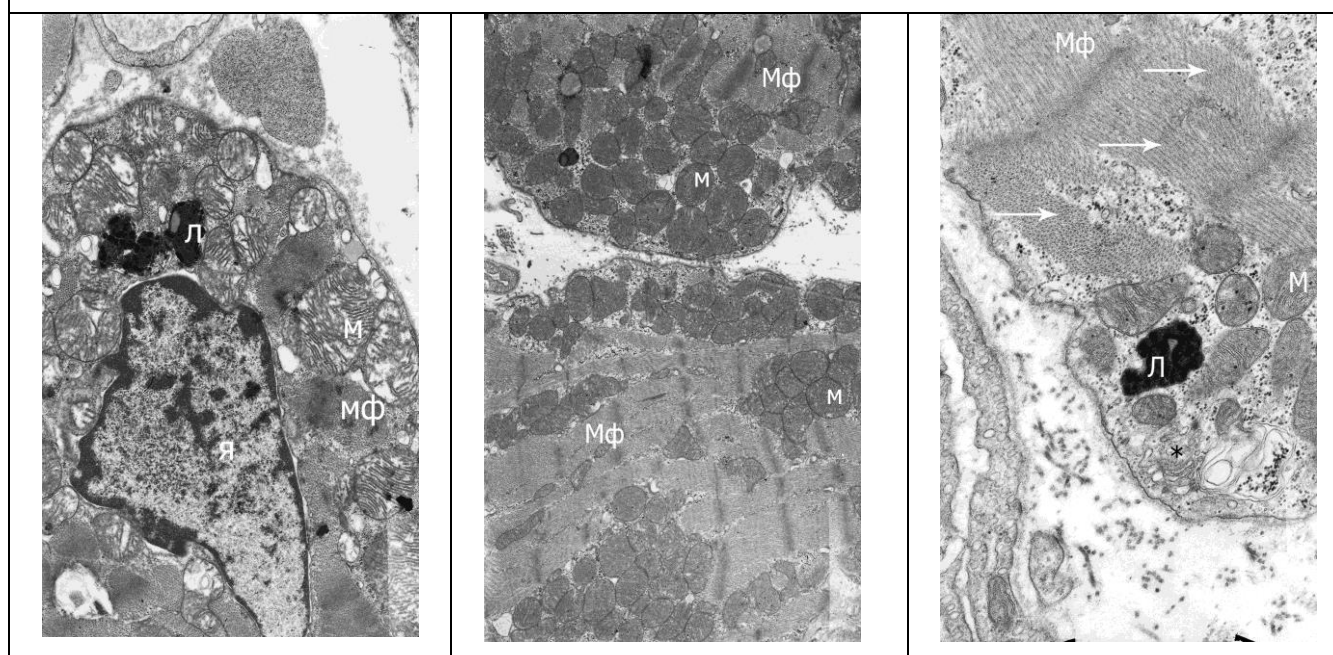
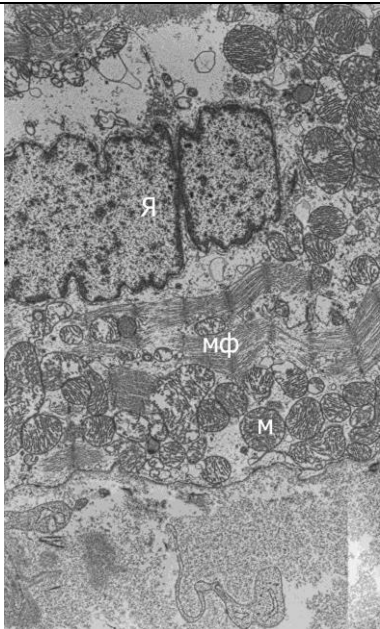
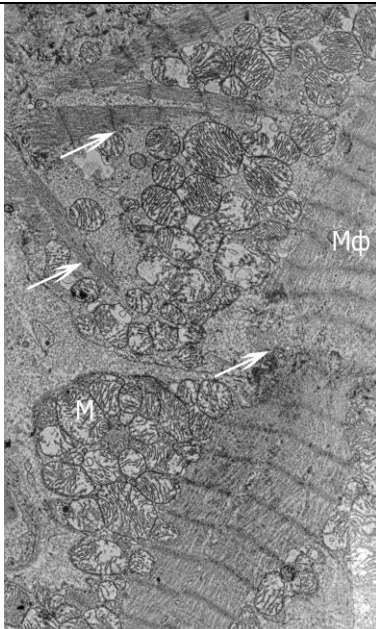
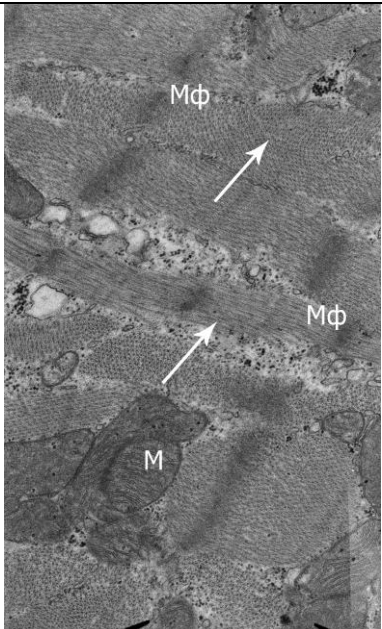
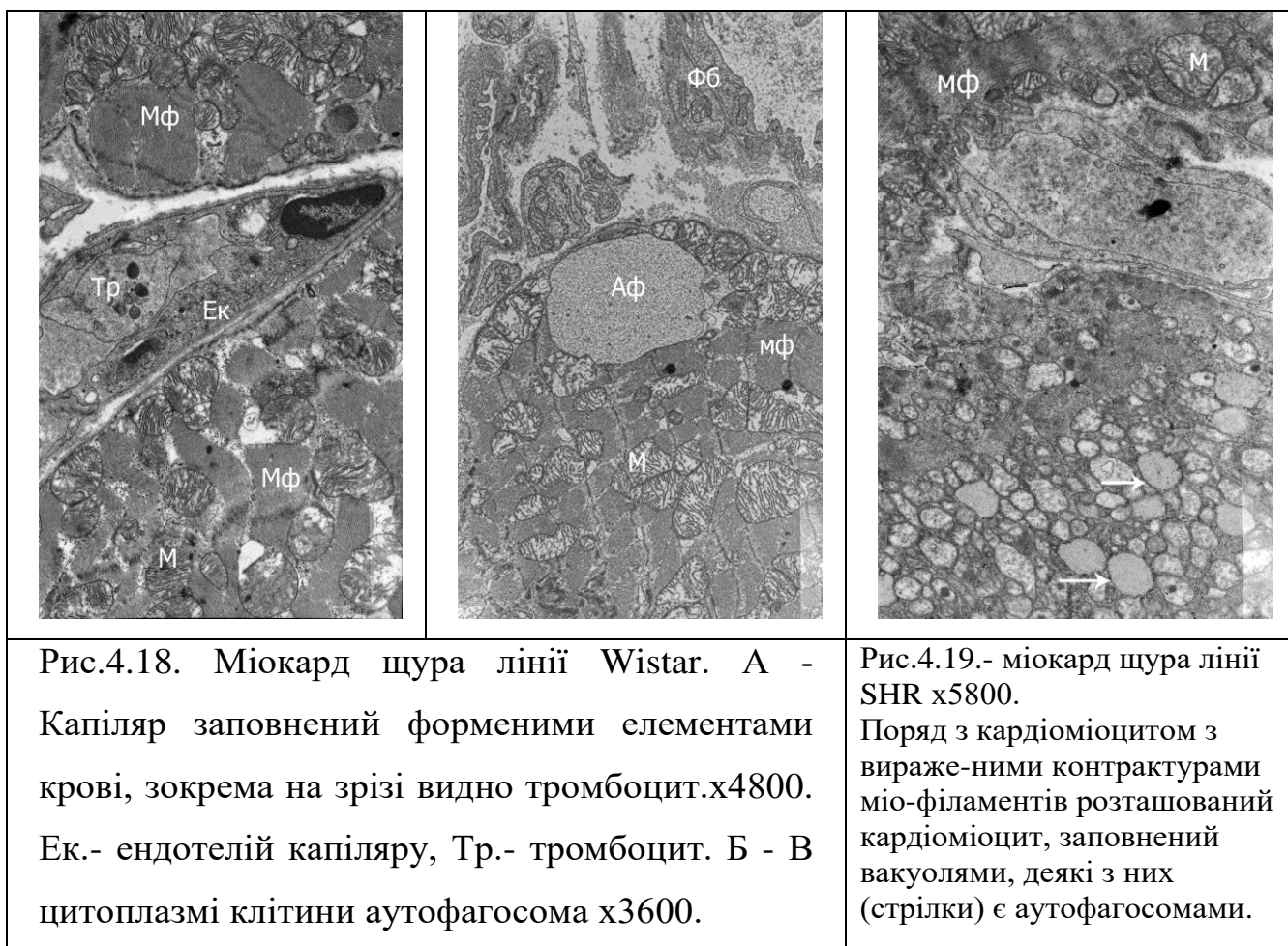


Рис. 4.15. Міокард щура лінії Wistar. Зміщення ядра (А) x5800, мітохондрій (Б) x3600 та апарату Гольджі (В)x10000 на периферію кардіоміоцита. Л. – лізосоми, стрілки вказують на прояви порушення просторової орієнтації міофіламентів.

		
<p>Рис. 4.16. Міокард щура лінії SHR x3600. Перинуклеарний набряк, лізис.</p>	<p>Рис. 4.17. А - Міокард щура лінії SHR x3600. Б - Міокард щура лінії Wistar x 10000 . Стрілки вказують на ділянки кардіоміоцитів, що містять прояви «disarray».</p>	



Одержані результати добре відповідають даним інших досліджень з використанням ехокардіографії, мікроелектродних досліджень одиничних міокардіоцитів. За даними [Qiu, et. al., 2012], SHR з розвитком СН характеризувалися значним зменшенням фракції викиду лівого шлуночка, зростанням кінцево-діастолічного діаметра лівого шлуночка та його об'єму. Наші результати вказують на відсутність дилатації лівого шлуночка у щурів у передстаречому віці. При морфологічних дослідженнях також показано пошкодження міофібрил, вакуолізацію мітохондрій та набряк саркоплазматичного ретикулуму, розвиток фіброзу міокарда, що може бути підставою систолічної, діастолічної та ендотеліальної дисфункції серця і судин у щурів SHR.

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. Разом з тим у щурів лінії SHR виявляється адаптивний ангиогенез, що забезпечує посилення кровопостачання міокарда.

Це дає можливість у перспективі використовувати щурів передстаречого віку лінії SHR з ознаками ремоделювання міокарда як модель початкової стадії розвитку СН при артеріальній гіпертензії. Такі дані можуть мати практичне застосування й у майбутніх дослідженнях слугувати розробці профілактичних заходів щодо даної патології.

4.4. 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.4.20).

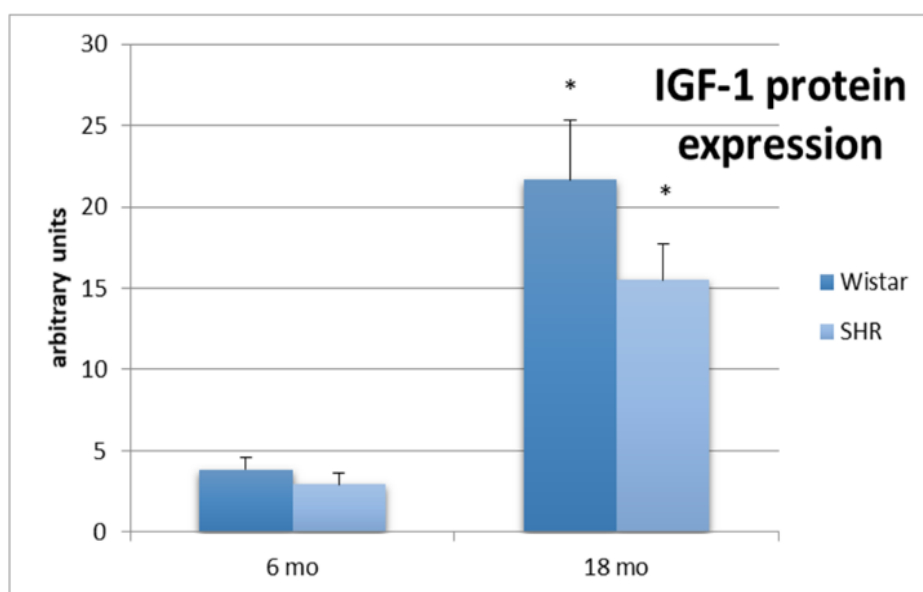


Рис. 4.20. Експресія білка IGF1 у лівому шлуночку серця щурів Wistar та SHR віком 6 та 18м. *P<0,05 порівняно з вихідним рівнем, #P<0,05 порівняно з щурами Wistar.

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. 4.21). Це могло бути причиною виявленого у них зростання експресії білка IGF1 (див. рис.4.22).

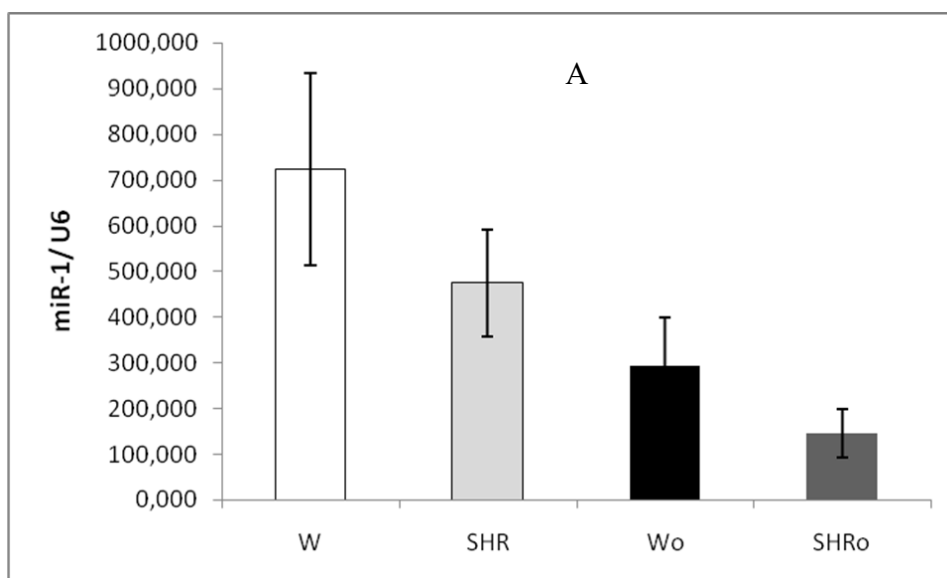


Рис.4.21. Експресія мікроРНК-1 у лівому шлуночку серця щурів Wistar та SHR віком 6 та 18м;

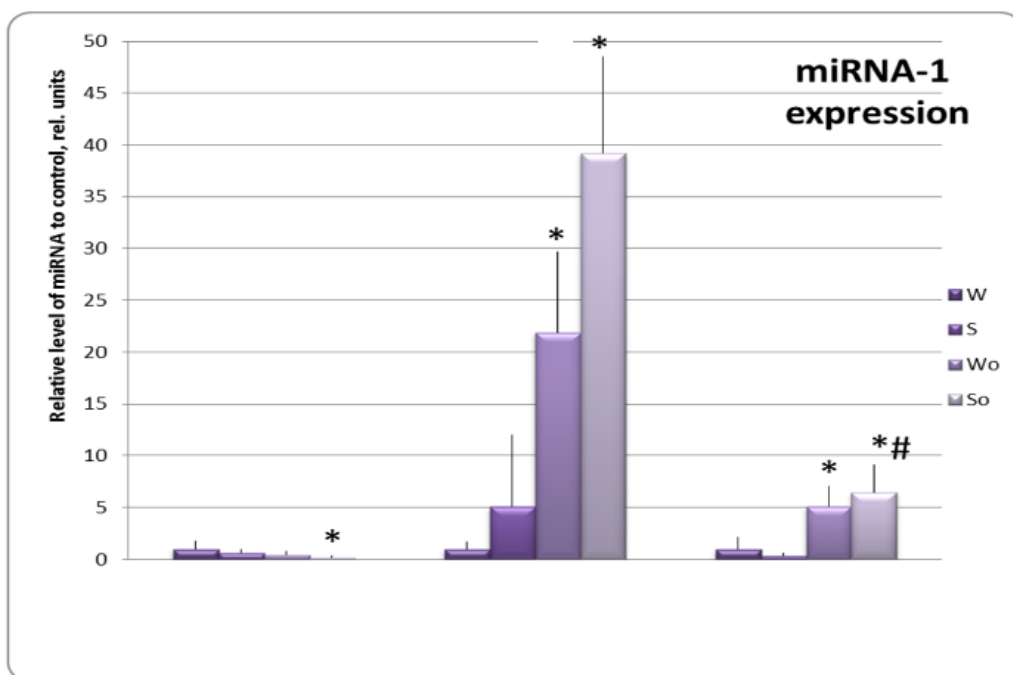


Рис.4.22. Рівень та активність біогенезу мікроРНК-1 у дорослих нормо- (W) і гіпертензивних (S) та старих нормо- (Wo) і гіпертензивних (So) щурів. * - відповідна група статистично значущо відрізняється від контролю (W) # - відповідна група статистично значущо відрізняється від дорослих гіпертензивних 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. , 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.

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

ССЗ залишаються головною причиною смертності в усьому світі, спричинивши в минулому році 17,3 млн. летальних випадків, що склало 31,5% у загальній смертності та 45% унаслідок неінфекційних недуг [160]. У країнах Європи ССЗ обумовлюють 4 млн. смертей щорічно, що складає 45% (49% – серед жінок та 40% – серед чоловіків). Слід зауважити, що даний показник є вищим на теренах Східної Європи, у тому числі й в Україні [160].

Експериментальні та клінічні дослідження свідчать, що гіпертрофія ЛШЛ внаслідок артеріальної гіпертензії є прогностично несприятливим чинником у хворих на гострий ІМ щодо зростання випадків раптової серцевої смерті та активації процесів ремоделювання міокарда як у ранніх фазах недуги, так і в віддаленому періоді [161][162]. Порівняно з нормальною геометрією, небажані події частіше трапляються в випадку концентричної гіпертрофії ЛШЛ, рідше (проте статистично вірогідно) – за умови концентричного ремоделювання чи ексцентричної гіпертрофії [163].

Відповідно до сучасного визначення ГМ – це зміни розміру та маси серцевого м'яза, що виникає внаслідок збільшення розміру кардіоміоцитів та зміни інших компонентів серцевого м'яза, таких як позаклітинний матрикс, а також його геометрії, форми, композиції та функції даного органу в результаті перевантаження чи пошкодження [6]. Ремоделювання лівого шлуночка частіше виявляється за умови наявності АГ та розглядається як один із пристосувальних механізмів до гемодинамічного перевантаження серця у відповідь на системну гіпертензію [8].

Розвиток та механізми термінової гіпертрофії міокарда

Відомо, що адренергічна стимуляція сприяє розвитку гіпертрофії, однак процеси її розвитку досі не було детально охарактеризовано. Нами вперше охарактеризовано динаміку розвитку гострої гіпертрофії лівого шлуночка серця у інтактних тварин (щури-самці лінії Wistar) протягом 7 діб введення адренергічного стимулятора (ізопротеренол в малих дозах) та зворотню динаміку до 30 діб експерименту. Зокрема, показано, що морфометричні ознаки гіпертрофії проявляються з третьої доби від початку введення препарату, зростають до 7 доби, а після завершення впливу ізопротеренолу зазнають зворотнього розвитку. Часткова регресія гіпертрофії спостерігалася через тиждень після припинення адренергічної стимуляції (на 14-ту добу експерименту), повна – через 3 тижні (на 30-ту добу експерименту). Одержана динаміка свідчить, що інтактний міокард здатний до швидкої гіпертрофічної перебудови при впливі прогіпертрофічного стимулу та її зворотнього розвитку в разі припинення впливу такого стимулу.

Визначені нами терміни розвитку та зворотнього розвитку гіпертрофії міокарда відповідають даним, описаним в літературі. Зокрема, Кузьменко М.О. та співавт. (2011) показали, що через 26 діб після впливу прогіпертрофічного стимулу не спостерігалось проявів гіпертрофії міокарда у щурів Вістар. Однак раніше не було продемонстровано детальну динаміку гіпертрофічної відповіді міокарда на адренергічну стимуляцію та її зворотнього розвитку, які охарактеризовані в нашій роботі.

Зміни міокарда при гострій гіпертрофії супроводжувалися порушенням функції серця. Гостра гіпертрофія призводила до зменшення показників насосної функції, зокрема, хвилинного об'єму крові – на 42,3%. Також введення ISO супроводжувалось достовірним зниженням ЧСС у на 6,8% та

ФВ на 43,6%. Ударний об'єм (УО) достовірно знижувався на 38,4%. Ударна робота (УР) – на 56,7%. Подібні дані отримано в роботах багатьох авторів при тривалому використанні β -агоністів [164] [165] [166].

Відомо, що систолічна та діастолічна дисфункції серця виникають не одночасно і можуть бути окремими складовими розвитку патологічних процесів, в тому числі, серцевої недостатності [Штегман О.А. Систолическая и диастолическая дисфункции левого желудочка – самостоятельные типы сердечной недостаточности или две стороны одного процесса? / Штегман О.А., Терещенко Ю.А. // Кардиология. – 2004. – №2. – С.82-86.]. Разом з тим, механізми цих порушень залишаються недостатньо дослідженими. За умов гострої гіпертрофії нами було виявлено зміни діастолічної функції серця: КДО достовірно збільшувався на 13,7%, але КДТ не змінювався. Встановлено достовірне зменшення величини максимальної швидкості розслаблення міокарду на 33%. Ізоволюмічна константа розслаблення лівого шлуночка τ_w не змінювалась.

При гострому пошкодженні міокарда, за даними різних авторів, не спостерігали глибоких порушень показників скоротливої функції серця [167] [168] [169] . Можливо це є наслідком первинності діастолічної дисфункції та перебудови позаклітинного матриксу у процесі ремоделювання серця ще до появи ознак порушення скоротливості міокарду [170]. Крім того, після β -адренергічної стимуляції нами відмічено досить неочікуване посилення скоротливості та скоротливої активності, що можна розглядати як компенсаторну реакцію, спрямовану на відновлення насосної функції серця. Подібне підвищення показників скоротливості описано у деяких роботах раніше, наприклад, при тампонаді серця чи на ранній стадії СН (1 тиждень після ІМ) [171]. Разом з тим, за даними інших досліджень відомо, що тривала активація β -АР серця

призводить до змін кількості рецепторів β -1 та β -2 підтипів, роз'єднання рецепторів з аденілатциклазою, зменшення іотропних реакцій міокарду, а отже і адаптивного регуляторного резерву, здатного до реалізації у відповідь на стимули [172]. У роботі Shioura K. та співав. (2008) проведено аналіз гемодинамічних показників у мишей різної статі у постінфарктному періоді [173]. Під час ранньої фази гіпертрофії спостерігали суттєве виснаження залежних та незалежних від навантаження гемодинамічних параметрів. Пізніше компенсаторна гіпертрофія відзначалася нормалізацією об'ємів до контрольного рівня у самок порівняно з самцями.

Отже, постає питання відносної участі у розвитку насосної дисфункції серця при дії ІЗО, з одного боку, порушень скоротливості міокарду внаслідок загибелі кардіоміоцитів, з іншого – дилатації. У дослідженнях групи вчених під керівництвом Osadchii O. E. за допомогою ехокардіографії та на ізольованих препаратах серця було встановлено відсутність змін скоротливості міокарду, що, ймовірно, може пояснюватися значним підвищенням вивільнення норадреналіну, посиленням α -АР-опосередкованих скоротливих реакцій та компенсаторною гіпертрофією міокарду [168]. Натомість насосна дисфункція серця була пов'язана з дилатацією ЛШЛ, оскільки спостерігалось збільшення внутрішніх розмірів порожнини ЛШЛ, а також зсув співвідношення діастолічного тиску-об'єму [168] [174]. Отже, на думку авторів, тривала стимуляція β -АР може призводити до насосної дисфункції в першу чергу шляхом індукції дилатації, а не порушень скоротливості міокарду. Наші експерименти дозволяють доповнити уявлення про механізми порушень насосної функції серця після β -адренергічної гіперстимуляції, а саме вказують на важливу роль фібротичної перебудови міокарду і діастолічної дисфункції.

Систолічну дисфункцію серця ми виявили за зміною таких показників як: КСО, який збільшувався на 67%; КСТ, який достовірно знижувався на 21,5%. Максимальна швидкість скорочення шлуночка dP/dt_{max} знижувалась на 12,4%, що вказує на погіршення ефективності скорочення лівого шлуночка при гострій гіпертрофії. Введення ІЗО щурам лінії Wistar не викликало значущих змін показника артеріальної жорсткості.

Таким чином, у щурів Wistar після β -адренергічної стимуляції відбувається послаблення діастолічної і систолічної функції серця. Наші комплексні функціональні та морфологічні дослідження дозволили встановити зв'язок між порушенням діастолічної функції та фібротичними змінами тканини серця.

Відомо, що фіброз міокарда є основою для зміни його жорсткості, що в свою чергу призводить до розвитку діастолічної, а також певною мірою систолічної дисфункції ЛШЛ [Штегман О.А. Систолическая и диастолическая дисфункции левого желудочка – самостоятельные типы сердечной недостаточности или две стороны одного процесса? / Штегман О.А., Терещенко Ю.А. // Кардиология. – 2004. – №2. – С.82-86.].

Є свідчення, що у тварин через 3 тижні після β -адренергічної гіперстимуляції відбувалося посилення скоротливої функції серця порівняно з контролем [175]. Вважають, що посилення скоротливої здатності тканини серця може бути пов'язано з розвитком компенсаторної гіпертрофії серця, посиленням вивільнення норадреналіну з нервових закінчень, а також підвищенням скоротливих відповідей на активацію α -АР міокарда [168]. Деякі автори вказують на те, що власне β -адренергічна активація не порушує скоротливу функцію міокарда [176], скоріше за все це відбувається внаслідок дилатації порожнини ЛШЛ на більш пізніх термінах (до 3 місяців) застосування ІЗО [168]. Разом з тим, показники

кардіогемодинаміки раніше не було досліджено в динаміці розвитку гострої гіпертрофії, що дозволяє нам уточнити характер змін. Зокрема, наші результати у сукупності з даними (Кузьменко) можуть свідчити, що розвиток гострої гіпертрофії лівого шлуночка супроводжувався його дисфункцією, а зворотній розвиток гіпертрофії протягом 3 тижнів – відновленням і навіть покращенням скоротливої функції серця.

Нами вперше охарактеризовано зміни ультраструктури міокарда через 7 діб впливу ІЗО. Адренергічний вплив, крім власне гіпертрофічного росту, супроводжувався вогнищевими порушеннями архітектоніки кардіоміоцитів, субсарколемальним набряком, лізисом та контрактурами міофіламентів, тобто ознаками пошкодження. На тлі термінової гіпертрофії кардіоміоцитів відбувалося порушення притоку крові до тканин лівого шлуночка серця та явища гіперактивації ендотелія, що також могло сприяти загибелі кардіоміоцитів і прискорювати ремоделювання серця. Слід зауважити, що після β -адренергічної стимуляції у наших експериментах спостерігалось виражене заміщення скоротливої тканини сполучною, особливо в зоні ендокарду, що, на нашу думку, пов'язане з характерною локалізацією β -АР в цій зоні [166]. Отримані в наших експериментах дані щодо значного розвитку ендокардіального фіброзу узгоджуються з даними інших дослідників [164] [166]. За допомогою імуногістохімічних методів досліджень деякі автори встановили, що за умов тривалої дії β -адренергічних агоністів відбувається акумуляція колагену I та III типу [177] [169]. Однак слід брати до уваги, що структурні перебудови при ГМ залежать від балансу білків і відображується на функціональному стані серця, який може характеризуватися збереженням скоротливої функції внаслідок переважного розвитку концентричної гіпертрофії серця та/або діастолічними порушеннями в результаті зростання жорсткості міокарда

[168]. Показано, що більш тривала β -адренергічна стимуляція (зокрема, впродовж 3 місяців) призводить до дилатації ЛШЛ та розвитку СН [170]. Важливо відмітити той факт, що при адаптивних змінах серця фібротична перебудова міокарду не розвивається, це є ознакою виключно дезадаптивного процесу.

В динаміці термінової гіпертрофії та її зворотнього розвитку нами вперше визначено зміни прогіпертрофічних, структурних та регуляторних білків у ЛШЛ серця. Експресія білка дистрофіну у шлуночках серця щурів у процесі гострої гіпертрофії не відповідала параметрам зростання маси кардіоміоцитів. Відставання процесів синтезу цього великомолекулярного білка спостерігалось на 3 добу експерименту з відновленням тільки на 5 добу. Після цього експресія дистрофіну поступово знижувалася, максимальна її редукція спостерігалася на 30 добу, показники були у 2,8-3,0 рази меншими від контролю ($P < 0,05$). Одержані показники свідчать, що у щурів лінії Вістар адренергічна стимуляція призводить до повільного компенсаторного відновлення експресії дистрофіну у гіпертрофованому міокарді протягом 5 діб. В подальшому спостерігається прогресивне виснаження експресії білка дистрофіну у шлуночках серця, яка не відновлюється протягом місяця спостережень. Оскільки дистрофін підтримує цілісність клітинної мембрани кардіоміоцитів при їх скороченні нестача цього білка може сприяти пошкодженню гіпертрофованих клітин, ці зміни можна розглядати як ранній фактор ризику розвитку СН, який може залежати від регуляції на рівні геному [94] [178] [179]. Важливо також, що нестача дистрофіну зберігалася тривалий час, незважаючи на зворотній розвиток гострої гіпертрофії. Одержані показники відповідають морфологічним проявам пошкодження тканини серця і розвитку фіброзу міокарда.

При дослідженні експресії білка SERCA2a виявлено, що цей білок індукувався у міокарді протягом 5-7-ї доби розвитку гострої гіпертрофії і залишався підвищеним до 14-ї доби. Ця динаміка добре асоційована в часі з проявами розвитку і зворотнього розвитку гострої гіпертрофії. За спостереженнями інших авторів, ... (Література?) Таким чином, при гострій гіпертрофії зміни експресії білка SERCA2a відповідають морфометричним змінам, але не супроводжуються повним забезпеченням скоротливої функції серця, ймовірно, через пошкодження частини кардіоміоцитів. Отже, нестача функціональної здатності міокарда при терміновій гіпертрофії більшою мірою може бути пов'язана з нестачею кількості функціонуючих кардіоміоцитів, тоді як забезпечення їх скоротливими білками достатнє.

Особливу цікавість представляли зміни експресії молекулярних чинників, які могли бути залученими до розвитку гіпертрофії та/або забезпечувати функцію гіпертрофованого міокарда. Динаміка змін таких молекулярних факторів, як ланки сигнального шляху IGF-1/Akt, білки SERCA2, дистрофін, в процесі розвитку гострої гіпертрофії досліджена нами вперше.

Встановлено, що експресія білків прогіпертрофічного сигнального шляху (Akt, HSP60) зростала протягом введення ізопротеренолу, досягаючи максимальних показників на 5-7 добу. Експресія білка IGF-1 досягала максимуму на 3 добу адренергічної стимуляції, що підтримувалося значною редукцією експресії гальмівної мікроРНК-1 в цей період. Висока експресія цього білка до 7-ї доби забезпечувалася зростанням трансактивації гена від 3 до 7 доби введення препарату, тоді як експресія мікроРНК-1 за цей період відновлювалася лише незначно. Після завершення впливу ізопротеренолу спостерігали поступове відновлення цих показників, на 14-ту добу відновлювалися ланки сигнального шляху,

на 30-ту – спостерігали зміни молекулярних чинників, які свідчили про обмеження IGF-1-залежної прогіпертрофічної відповіді за рахунок зменшення експресії мРНК IGF-1. Водночас функціонування сигнального шляху IGF-1/Akt забезпечувалося відновленням рівня білків IGF-1 та Akt до вихідних значень і збільшеною експресією кофактора HSP60. Таким чином, після зворотного розвитку гострої гіпертрофії міокарда формувалася система «швидкої готовності» до гіпертрофічної відповіді шляхом активації сигнального шляху IGF-1/Akt, але можливості її посилення за рахунок зростання експресії IGF-1 обмежувалися.

Потрібно зазначити, що проведення сигналу через шлях IGF-1/Akt у клітині призводить до покращення виживання клітин, пригнічення апоптозу та посилення проліферативної відповіді, в тому числі через активацію mTOR-залежного синтезу білка (...). При зростанні навантаження на серце така відповідь є захисною, але призводить до гіпертрофії кардіоміоцитів і серця в цілому. В цих умовах механізми, що ведуть до обмеження (контролю) гіпертрофічної відповіді і можливого її зворотного розвитку, є компенсаторними і попереджують патологічне ремоделювання серця і розвиток серцевої недостатності. В ряді літературних джерел розглядають механізм IGF-1/Akt/mTOR, як сприятливий, захисний, а роль патогенетичного чинника відводять стресзалежним кіназам (...). Однак наші дослідження свідчать про більш складну роль шляху IGF-1/Akt/mTOR, коли захисні або патогенні наслідки можуть залежати від інтенсивності його активації в клітині, незалежно від функції альтернативних сигнальних механізмів.

Розвиток та механізми сталої гіпертрофії міокарда.

Отримані нами результати експериментальних досліджень на щурах зі спонтанною гіпертензією та впливом ізопротеренолу вказують на складні

різноспрямовані зміни кардіогемодинаміки, структури серця і судин, а також на зміни молекулярно-генетичних механізмів, що залучені до процесу розвитку гіпертрофії та їх поєднання, що потребує детального аналізу.

Для дослідження впливу сталої гіпертрофії міокарда, викликаного зростанням післянавантаження на серце, як модель було обрано щурів зі спонтанною гіпертензією (SHR) – лінії, похідної від Wistar, що була селекційно виведена з щурів Wistar з найвищим артеріальним тиском, що за даними дослідників найбільш близько відповідає розвитку гіпертензії у людей [180]. Відомо, що прояви гіпертензії спостерігаються у цих щурів приблизно з 4-місячного віку, тому розвиток гіпертрофії міокарда в експериментальній групі щурів віком 6 місяців тривав приблизно 2-3 місяці. У дослідженнях на щурах показано, що SHR мають меншу порівняно з Wistar ефективність функціонування мітохондрій серця, зокрема, мембранний потенціал мітохондрій, а швидкість споживання кисню у спокої більша, тобто більш напружена робота дихального ланцюга [Дорофеева Н.О., Гошовська Ю.В., Сагач В.Ф., "Мембранний потенціал мітохондрій серця і швидкість споживання кисню у щурів із генетично детермінованою артеріальною гіпертензією," Фізіологічний журнал, vol. 57, no. 3, pp. 3-9, 2011.], можливо це стало передумовою змін в роботі міокарда які ми також спостерігали.

Виявлено, що у цих щурів були наступні прояви гіпертрофії лівого шлуночка серця: показники були вищими на всіх стадіях експерименту, спостерігали різке зростання концентричної гіпертрофії вже у перші 3 доби, що призводило до значної летальності (65% тварин) внаслідок різкого погіршення насосної функції серця, тобто, ці показники були більшими, ніж при гострій гіпертрофії міокарда у щурів Wistar. Ці зміни є одним із етапів патогенезу серцевої недостатності, і як видно з наших

досліджень в більшій мірі проявляється у SHR. Введення ізопротеренолу шестимісячним SHR прискорює ремоделювання серця і в значній мірі також за рахунок загибелі кардіоміоцитів в результаті некротичних, апоптотичних та аутофагічних процесів, що стимулюються адренергічними впливами.

Крім змін структури і функції серця, викликаних хронічним післянавантаженням, виявлено було і зміни відповіді міокарда у SHR на прогіпертрофічний стимул. Для дослідження цієї відповіді SHR піддавали впливу малих доз ізопротеренолу протягом 7 діб. Перш за все, вплив прогіпертрофічного стимулу при наявності хронічної гіпертрофії викликав летальність 65% щурів протягом перших 3 діб, чого не спостерігалось у щурів без хронічної гіпертрофії (Wistar). Це може свідчити про значне зростання ризику раптової смерті при адренергічних впливах у людини або тварин з наявністю гіпертрофії міокарда, в тому числі, викликаній фізіологічними причинами (спорт, фізична робота тощо).

Встановлено, що адренергічна стимуляція супроводжувалася прогресивним ростом гіпертрофії лівого шлуночка серця у SHR до 7 доби експерименту. У щурів лінії SHR показники були вищими на всіх стадіях експерименту, спостерігали різке зростання концентричної гіпертрофії вже у перші 3 доби, проте у щурів лінії Wistar не спостерігали летальності під час експерименту. Після завершення адренергічної стимуляції у SHR не відбулося значної регресії гіпертрофії протягом місяця і показники не поверталися до вихідного рівня протягом 30 діб. Це свідчить про значний ризик прогресії гіпертрофії при наявності хронічного післянавантаження на серце, а також порушення механізмів зворотнього розвитку гіпертрофії після завершення впливу адренергічних чинників.

Оцінка площі фібротичних змін у міокарді через добу після завершення введення ізопротеренолу продемонструвала зростання фіброзу

в серці щурів обох ліній. Цікаво, що показники були вищими у щурів лінії Wistar, що може свідчити про активність компенсаторних механізмів, які зменшують адренергічні пошкодження серцевого м'яза, у SHR.

Відповідь на вплив ізопротеренолу у SHR характеризувалася такими відмінностями від щурів Wistar:

Значне зменшення показників насосної функції, зокрема, хвилинного об'єму крові – на 39,2%, в порівнянні з щурами лінії Wistar, проте введення ISO супроводжувалось достовірним збільшенням ХОК на чверть у щурів SHR. При хронічній гіпертрофії внаслідок збільшеного постнавантаження на серце у щурів SHR спостерігалось незначне зменшення ЧСС. Введення ISO супроводжувалось достовірним зниженням ЧСС у щурів Wistar на 6,8%, а у SHR – збільшенням на 22,4%. Таким чином, прогіпертрофічний стимул (ISO) протиспрямовано змінював ЧСС у щурів з наявністю хронічної гіпертрофії та без неї. Також у щурів SHR змінювався ще один показник насосної функції, як фракція викиду, що була достовірно нижчою порівняно зі щурами Wistar. Введення ISO викликало достовірне зниження EF на 43,6% у щурів Wistar і майже не вплинуло на EF - у SHR. Ударний об'єм (SV) у щурів SHR був достовірно меншим порівняно зі щурами Wistar. Введення ISO достовірно знижувало SV на 38,4% у щурів Wistar, але не впливало у SHR. Ударна робота (stroke work, SW) – в наших дослідях введення ISO супроводжувалось достовірним зниженням SW в половину у щурів Wistar та збільшенням SW більше ніж у два рази у SHR. При цьому варто зазначити, що вихідний показник SW у SHR був меншим на 73,8%.

Нами також було оцінено зміни діастолічної функції серця: кінцево-діастолічний об'єм (end diastolic volume, EDV), достовірно збільшувався за дії тривалої адренергічної стимуляції ISO як у SHR так і щурів Wistar. При

цьому у щурів SHR EDV був достовірно збільшений на 19,8%. Кінцево-діастолічний тиск (end diastolic pressure, EDP) під дією ISO збільшувався вдвічі у SHR і не змінювався у щурів Wistar. Таким чином, оцінка співвідношення EDV/ EDP дозволяє говорити про збільшення кінцево-діастолічної жорсткості порожнини ЛШ і про відсутність дилатації ЛШ. Ці зміни пов'язані зі збільшенням пасивної жорсткості міокарду, яка може бути обумовлена розвитком гіпертрофічних змін міокарда. Про ефективність розслаблення шлуночка в діастолі, говорять зміни величини dP/dt_{min} , встановлено достовірне зменшення величини максимальної швидкості розслаблення міокарду Wistar на 33%, та не значуще зменшення у щурів SHR, за дії тривалої адренергічної стимуляції ISO. При цьому у щурів SHR dP/dt_{min} була збільшена на 17%. Ізовольюмічна константа розслаблення лівого шлуночка τ_w є одним з найбільш достовірних показників діастолічного розслаблення, адже є залежною від переднавантаження, у щурів SHR τ_w був більшим на 38% в порівнянні з Wistar. При дії тривалої адренергічної стимуляції ISO спостерігалось зниження τ_w на 25% у SHR, при цьому у щурів Wistar цей показник не змінювався, це може вказувати на відстрочення розслаблення чи подовження періоду ранньої діастолі, коли відбувається закачування йонів кальцію до внутрішньоклітинних депо.

Скоротливу функцію серця ми оцінювали за показниками: кінцево-систолічний об'єм (end-systolic volume, ESV) введення ISO не змінювало ESV у щурів SHR, але достовірно збільшувало ESV на 67% у щурів Wistar. При цьому значення ESV було в двічі достовірно вищим у щурів SHR; кінцево-систолічний тиск (end-systolic pressure, ESP) при введенні ISO супроводжувалось збільшенням на 61,4% у SHR і достовірним зниженням ESP у Wistar. При цьому ми не виявили відмінностей в значеннях ESP між щурами ліній Wistar і SHR;

dP/dtmax або максимальна швидкість скорочення в шлуночку є важливим параметром в оцінці ефективності скорочення шлуночка. Він залежить від багатьох факторів, зокрема, перед- та постнавантаження, кількість серцевих скорочень, здатність кардіоміоцитів до скорочення. Введення ISO супроводжувалось збільшенням цього показника на 51,3% у SHR і незначним зниженням dP/dtmax у групі Wistar. При цьому значення dP/dtmax у щурів SHR було достовірно нижчим порівняно з Wistar.

Ми також спостерігали зростання артеріальної жорсткості при введенні ISO, що супроводжувалось збільшенням показника AE у SHR на 61%. При цьому варто зазначити, що введення ISO щурам лінії Wistar не викликав значущих змін цього показника. Також, артеріальна жорсткість у Wistar була на 45% нижчою, ніж у SHR.

Одержані нами результати відповідають даним інших досліджень з визначення функції серця SHR. Зокрема, при використанні ехокардіографії, мікроелектродних досліджень одиничних міокардіоцитів встановлено, що SHR характеризувалися систолічною дисфункцією, значним зменшенням фракції викиду лівого шлуночка, зростанням кінцево-діастолічного діаметра лівого шлуночка та його об'єму [181] [182].

Таким чином, наявність хронічної гіпертрофії обмежує відповідь міокарда на прогіпертрофічні чинники, зокрема, на адренергічну стимуляцію, що дозволяє обмежити ризик подальшого зростання гіпертрофії та його патологічні наслідки.

Експресія дистрофіну у шлуночках серця SHR була значно меншою, ніж у щурів Wistar ($P < 0,05$). Введення ізопротеренолу дещо підвищувало експресію білка на 3 добу, але після цього спостерігалось прогресивне виснаження рівня білка в шлуночках серця. На відміну від щурів лінії Wistar, щури SHR характеризувалися нестачею експресії дистрофіну, що корелює з їх значною летальністю при адренергічній стимуляції. Індукція

експресії дистрофіну при експериментальних впливах у цих щурів також була значно порушеною, максимальні показники були у 2-3 рази меншими, ніж у щурів Wistar, а тривалість індукції – значно скороченою, раніше наступало виснаження цієї реакції (на 3 добу). Відмінності експресії дистрофіну у щурів ліній Wistar та SHR, при адренергічній стимуляції охарактеризовано вперше.

При дослідженні експресії білка SERCA2 у SHR його експресія була значно більш високою проявом всього терміну дослідження, і додатково зростала на 5-у добу введення ізопротеренолу, це може свідчити про його компенсаторно підвищений рівень в цілому, але резерв його індукції менш значний.

У SHR, однак, індукції білка Akt не спостерігали, що може вказувати на обмеження Akt-залежних прогіпертрофічних реакцій.

Експресія білка HSP60, кофактора рецепторів IGF-1, не відрізнялася в міокарді щурів з наявністю хронічної гіпертрофії та без неї.

Згідно з цими результатами, наявність хронічної гіпертрофії у щурів 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 сталого функціонування міокарда. Відповідь на прогіпертрофічний стимул на тлі хронічної гіпертрофії у SHR зменшувалася і відбувалося обмеження прогіпертрофічного каскаду реакцій в кардіоміоцитах.

З огляду на відомості про стимуляторний вплив IGF-1 на сигнальні шляхи PI3K-Akt, які активують клітинний ріст, в тому числі, в кардіоміоцитах [Sussman MA ...], зростання експресії цього білка та його кофактора в міокарді щурів, які були піддані адренергічній стимуляції, може свідчити про участь IGF-1 у розвитку гіпертрофії лівого шлуночка за

цих умов. У свою чергу, ремоделювання лівого шлуночка, викликане зростанням периферичного опору судин при адренергічному впливі та прогіпертрофічними змінами експресії генів в кардіоміоцитах, спричинювало зміни насосної та діастолічної функції серця.

Таким чином, виявлено молекулярні механізми, які визначають і опосередковують перехід адаптивно-приспосувальної перебудови міокарда до патологічного ремоделювання і тенденції до розвитку серцевої недостатності, які можна підсумувати наступним чином:

1. Ізопротеренол-індукована термінова гіпертрофія ЛШЛ викликає індукцію структурного білка дистрофіна, білка ендоплазматичного ретикулуму SERCA2, кінази Akt, яка має відмінності на тлі хронічної гіпертрофії у щурів SHR.
2. Нестача структурного білка дистрофіна та втрата здатності до його індукції може бути одним з основних чинників раннього ризику розвитку серцевої недостатності у щурів, особливо за наявності адренергічної стимуляції і підвищеного артеріального тиску.
3. Пошкодження міокарда внаслідок адренергічної стимуляції включає в себе стрес ендоплазматичного ретикулуму, що може бути ланкою наступного розвитку недостатності лівого шлуночка. У щурів Wistar ізопротеренол-індукована гіпертрофія супроводжується транзиторною індукцією білка SERCA2, в той час як у SHR резерв індукції цього білка менш значний.
4. Кіназа Akt задіяна в сигнальних механізмах гіпертрофії міокарда у щурів Wistar, однак у SHR її індукція компенсаторно пригнічена.

Отримані нами результати експериментальних досліджень на щурах зі спонтанною гіпертензією та впливом ізопротеренолу вказують на складні різноспрямовані зміни кардіогемодинаміки, структури серця та судин, молекулярно-генетичних механізмів, що залучені до процесу розвитку гіпертрофії та їх поєднання, що потребує детального аналізу.

Вплив довготривалої гіпертрофії міокарда та старіння на морфологічні та кардіогемодимічні показники щурів Wistar та SHR

Динаміку хронічної гіпертрофії лівого шлуночка серця у щурів вивчали в онтогенетичному аспекті шляхом порівняння її проявів у щурів 6-ти і 18-ти місяців. 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 ($P<0.05$).

Як в одній, так і в другій групі тварин віком 18м 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. Мітохондрії, розміри яких в значній мірі різнилися, знаходились в різних стадіях пошкодження (внутрішні мембрани деформовані, простір між кристами розширений, в окремих клітинах виражений набряк мітохондрій з вакуолізацією та повною деструкцією внутрішніх мембран. Загальними для груп Wistar18м та SHR18м були вогнищеві зміни скорочувальної системи міокарда. Локально виявляли ділянки лізису та перескорочення міофіламентів. Необхідно відмітити активацію лізосомального апарату в обох дослідних групах. Одержані результати відповідають даним інших досліджень з використанням ехокардіографії, мікроелектродних досліджень одиничних міокардіоцитів. За даними [183], SHR з розвитком СН характеризувалися значним зменшенням фракції викиду лівого шлуночка, зростанням кінцево-діастолічного тиску лівого шлуночка та його об'єму. Результати

[184] [181] свідчать про прогресування гіпертрофії та дилатації лівого шлуночка, пролонгацію потенціалу дії, зростання жорсткості міокарда у SHR при старінні. Порівняно з цим, наші результати вказують на відсутність дилатації лівого шлуночка у щурів у передстаречому віці. При морфологічних дослідженнях також показано пошкодження міофібрил, вакуолізацію мітохондрій та набряк саркоплазматичного ретикулуму, розвиток фіброзу міокарда [183], що відповідає нашим результатам і може бути підставою для виникнення систолічної, діастолічної та ендотеліальної дисфункції серця і судин у щурів SHR.

Пошкодження серця різного генезу призводить до системної реакції організму і викликає зміни не тільки в структурі тканини серцевого м'язу, але й впливає на стан судин. Застосувавши методику аналізу кривих залежності тиску та об'єму ЛШ дозволило нам описати не тільки насосну та діастолічну функцію серця, його скоротливість, а й оцінити співвідношення між параметрами роботи серця та станом судинного русла, що визначає серцевий викид та тиск ЛШ. При визначенні кардіогемодинамічних показників у 18-місячних щурів Wistar і SHR були виявлені вікові зміни з суттєвими відмінностями у досліджуваних групах тварин.

З віком кінцево-діастолічний об'єм достовірно збільшувався щурів Wistar на 72%, в той час як у щурів SHR при тривалій хронічній гіпертрофії, індукованій збільшеним постнавантаженням на серце збільшувався лише на 8%; Встановлено, що у щурів SHR максимальна швидкість розслаблення міокарду dp/dt_{min} була збільшена на 17%. Також спостерігалось, достовірне зменшення величини максимальної швидкості розслаблення міокарду SHR на 44% при впливі довготривалої гіпертрофії та з віком. На противагу, значуще збільшення у старих щурів Wistar на 38%. Цей процес є досить енергоємним і може призводити до виснаження

енергетичних ресурсів міокарду. Описано, що підвищення значень цього показника характерно для спонтанно гіпертензивних щурів (віку 10-11 місяців), що поруч з іншими показниками може свідчити про діастолічну дисфункцію, при одночасному компенсаторному посиленні насосної функції внаслідок гіпертрофії кардіоміоцитів [185], це також співпадає з нашими результатами та припущеннями; Використання індексу – констант тривалості періоду ізоволюмічного розслаблення – τ – дозволило виявити, що у щурів SHR τ_w був більшим на 38% в порівнянні з Wistar. З віком також спостерігалось збільшення τ_w на 23% у щурів Wistar, в той час цей показник не змінювався у SHR 18м, при тривалому постнавантаженні.

Параметр оцінки ефективності скорочення шлуночка (максимальна швидкість скорочення) dP/dt_{max} у щурів SHR було достовірно нижчим порівняно з Wistar на 37,2%. Старіння з одночасним, довготривалим впливом гіпертензії супроводжувалось зниженням dP/dt_{max} у щурів SHR на 53%, в той час як вік не мав жодного впливу на цей показник у Wistar.

Ці зміни можна пояснити зростанням артеріальної жорсткості у SHR, адже показник артеріальної жорсткості у щурів Wistar був на 45% нижчим, ніж у SHR. Старіння у групі щурів Wistar супроводжувалось достовірним збільшенням показника AE на 73,7%, в той час як у групі SHR AE збільшилась лише на 22%, що свідчить про переважання післянавантаження серцевого м'яза, а також про наявність фібротичних змін в міокарді ЛШ.

Показник фракції викиду у щурів SHR був достовірно нижчим на 44,4% порівняно зі щурами Wistar. З віком внаслідок довготривалого впливу артеріальної гіпертензії на серце щурів SHR спостерігалось достовірне зниження ФВ на 28%, так само негативно вік вплинув на фракцію викиду у щурів Wistar на 44%. Систолічний об'єм у щурів SHR був достовірно знижений на 30,6% порівняно зі щурами Wistar. Вік та хронічна

гіпертрофія достовірно знижувала CO на 28% у щурів SHR, і старіння ніяк не вплинуло на щурів Wistar. Також, в наших дослідках старіння у щурів Wistar супроводжувалось зниженням показника ударної роботи (УР) на 18%. На противагу, вік та тривалий вплив артеріальної гіпертензії у щурів SHR не змінив показник CO. При цьому варто зазначити, що CO щурів SHR була на 73,8% нижчою, ніж у щурів Wistar. Старіння не супроводжувалось змінами ХОК у щурів Wistar, але достовірно зменшувався при впливі артеріальної гіпертензії у старих SHR на 31%. При цьому значення ХОК у щурів SHR було на 39,2% меншим, ніж у щурів Wistar. КДТ збільшився на 79,5% під дією тривалої хронічної гіпертрофії серця у SHR з віком, а також на 50% у щурів Wistar з віком. Проте у SHR був на 58% нижчим в порівнянні з Wistar. Таким чином, оцінка співвідношення КДО/ КДТ дозволяє говорити про збільшення кінцево-діастолічної жорсткості порожнини ЛШ і відсутність дилатації ЛШ. Ці зміни пов'язані зі збільшенням пасивної жорсткості міокарду, яка може бути обумовлена розвитком гіпертрофічних змін міокарда [Лапікова-Бригінська Т.Ю., Гончаров С.В., Портніченко Г.В., Тумановська Л.В., Портніченко А.Г., Досенко В.Є., Мойбенко О.О., "Вікові зміни структури і функції серця у спонтанно гіпертензивних щурів," Вісник морфології, vol. 20, no. 2, pp. 383-388, 2014]

Кінцево-сistolічний об'єм (КСО) є найменшим об'ємом лівого шлуночка, тому він залежить від здатності серця до скорочення та від постнавантаження. Значення КСО було в два рази вищим у SHR. З віком КСО зростав на 164% у щурів Wistar та не змінювався у SHR18м. Кінцево-сistolічний тиск (КСТ) він є залежним від переднавантаження згідно з законом Франка-Старлінга. Ми не виявили відмінностей в значеннях КСТ між щурами ліній Wistar і SHR. Однак, з віком у показник КСТ зростав на 33% у щурів Wistar, і знижувався на 20% у щурів SHR. З огляду на

відмінності функціонування серцево-судинної системи у щурів Вістар та SHR, розвиток серцевої недостатності з віком значно більшою мірою виражений у останніх. Схожі зміни в роботі серця з впливом хронічної артеріальної гіпертензії також були опубліковані в роботах [186] [187].

У передстаречому віці щури лінії SHR характеризуються наявністю змін структури і функції серця, які відповідають розвитку перших стадій патологічного ремоделювання з переважанням гіпертрофії [181], фіброзу міокарда, насосної та діастолічної дисфункції. Разом із тим, у щурів лінії SHR виявляється адаптивний ангіогенез [188], що забезпечує посилення кровопостачання міокарда. Дослідження ремоделювання міокарда у щурів SHR передстаречого віку може бути використано в подальшому як модель початкової стадії розвитку серцевої недостатності при артеріальній гіпертензії.

Зміни експресії мікроРНК-1 та форм її дозрівання у щурів різного віку та зі сталою ГМ.

В зв'язку з тим, що мікроРНК-1 є ключовою, що експресується в міокарді та відіграє важливу роль у роботі серця [189], ми дослідили реакції мікроРНК-1 та рівні її попередників при старінні та впливі хронічної гіпертрофії лівого шлуночка серця. У тканині ЛШЛ серця тварин віку 18м, рівень зрілої мікроРНК-1 був в 2,5 та 3,25 рази нижчим порівняно з молодими щурами відповідної групи ($p < 0,05$). У той же час, рівень первинної мікроРНК-1 як у Wistar, так і у SHR був значно вищим: у 7 разів між групами W_0 та W ($p < 0,05$) та у 17 разів між SHR_0 та SHR ($p < 0,05$). Ми спостерігали в 22 рази вищий рівень незрілої мікроРНК-1 для Wistar ($p < 0,05$) та в 5,9 рази вищий рівень для гіпертензивних ($p < 0,05$) вікових щурів порівняно з відповідними групами контролю бм. Отже, ми можемо, припустити, що саме старіння, а не наявність хронічної

артеріальної гіпертензії впливає на рівень мікроРНК-1 та рівні його попередника більшою мірою.

У серці старих нормотензивних та щурів з хронічною гіпертрофією міокарда рівні експресії мікроРНК-1 були низькими, але рівні первинної та незрілої мікроРНК-1 були підвищеними, ми навіть побачили протилежний ефект. Це накопичення мікроРНК-1-попередників, можливо, вказує на зміну посттранскрипційної обробки біогенезу мікро-РНК-1. Отриманий результат може свідчити про знижену ефективність дозрівання мікроРНК-1 у SHR, що підтверджується найбільшим розміром ефекту для цієї групи (SHRo). Показано, що мікроРНК регулюють різні фізіологічні та патофізіологічні процеси. Зокрема, вони беруть участь у розвитку ССЗ та старінні як у людини, так і у щурів [190] [151]. Хоча більшість дослідників зосереджені на зміні рівня зрілої мікроРНК за даних умов, зміни незрілих мікроРНК та регуляція їх дозрівання залишаються недостатньо дослідженими. Ми припускаємо, що цей аспект у дослідженнях патологічних станів недооцінений і може з'ясувати нові перспективи в цій галузі. Раніше ми показали, що аноксія-реоксигенація впливає на рівень зрілої та незрілої мікроРНК-1 у первинній культурі щурячих неонатальних кардіоміоцитів [153].

Було показано, що в серцях новонароджених щурів рівень зрілої мікроРНК-1 був нижчим, ніж у серцях дорослих [191]. У сукупності з нашими результатами це спостереження підтримує гіпотезу про можливу феталізацію ("ембріоналізацію") міокарда у відповідь на пошкодження [192] [193]. На початку активуються захисні механізми ремоделювання серця, включаючи морфологічні, функціональні та метаболічні модифікації, викликані реактивацією експресії генів, що експресуються в натальному періоді [194]. Згодом кровообіг в серці та його іннервація

порушуються і обмінні процеси зсінюються, що призводить до декомпенсації функції серця.

Серед адаптивних механізмів реагування на стрес та постнавантаження дуже важливим є формування так званих гранул стресу, оскільки воно модулює не тільки трансляцію мРНК, але й дозрівання мікроРНК [195]. Вважається, що порушення біогенезу мікроРНК пов'язане з утворенням стресових гранул і супроводжується надмірною експресією білка TDP-43, що зв'язує РНК. Чен та співавтори показали, що надмірна експресія мікроРНК-1 у міобластах значно збільшує міогенез, але пригнічує проліферацію міобластів [196]. Передбачається, що взаємодія TDP-43-мікроРНК-1 може контролювати розвиток та гомеостаз м'язів дорослої людини, підтримуючи баланс у цій спільно транскрибованій родині мікроРНК [197]. Таким чином, феталізація серця, спричинена стресом, також може впливати на дозрівання мікроРНК.

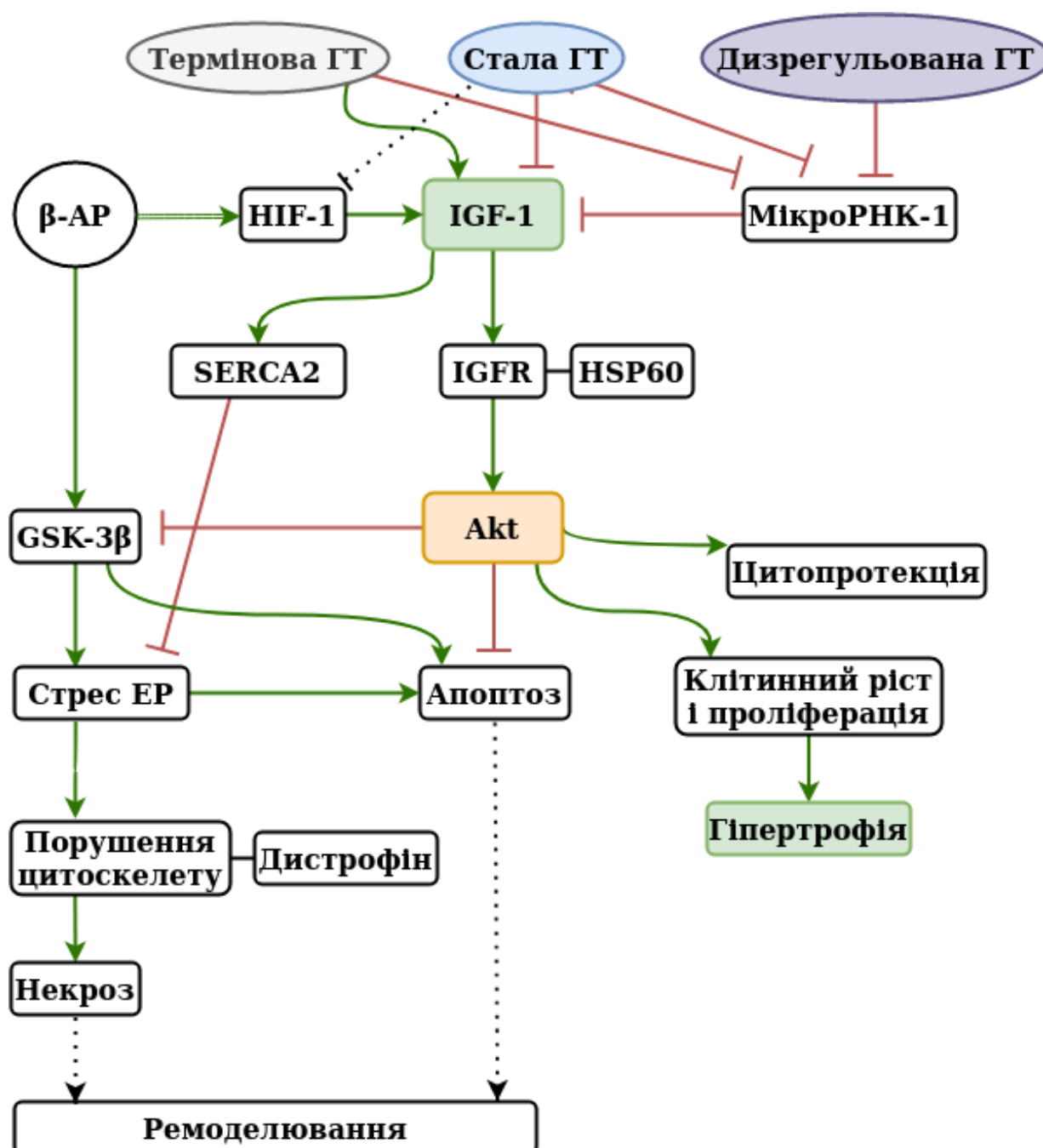
Оскільки клітинний стрес важливий при гіпертензії та старінні, виявлення зв'язків між медіаторами стресу та механізмами, пов'язаними з мікроРНК, може стати перспективним пунктом дослідження. Порушення дозрівання мікроРНК може активувати патологічні шляхи, знижуючи стійкість до стресу і призводячи до порочного циклу підвищеного стресу, що проявляється в дисфункції системи та загибелі клітин [198]. У нашій попередній роботі ми показали змінену функцію серця, пов'язану з порушеннями експресії кардіоспецифічних генів у моделі щурів діабетичної кардіоміопатії [199].

У цій роботі ми вперше показали суттєві зміни рівня форм попередників мікроРНК-1 у міокарді щурів старечого віку, як нормо-, так і гіпертензивних груп тварин. Порушення біогенезу мікро-РНК-1 може розглядатися як частина ембріоналізації серця, пов'язаної з серцевою недостатністю. Відповідно до наших результатів, у гіпертрофованих ЛШ

серця виявлено зниження рівня мікроРНК-1, тоді як його достатня кількість сприяє електрофізіологічному дозріванню шлуночків та їх специфікації, включаючи модуляцію іонних каналів, вивільнення Ca^{2+} та зв'язок збудження-скорочення [189] [200]. Отримавши такі результати можна припустити, що зміна дозрівання мікроРНК-1 є частиною перепрограмування серця, також відомого як ембріоналізація, що спостерігається при старінні серця та хронічній гіпертрофії міокарда, що спричинена довготривалим впливом артеріальної гіпертензії. Подальші дослідження допоможуть з'ясувати механізми неправильної регуляції мікроРНК-1, що ми спостерігали, і відкриють новий напрямок для розробки лікування серцевої дисфункції, пов'язаної з гіпертонією та старінням.

Отже ми продемонстрували прогресивні зміни серцево-судинної системи за наявності хронічної ГМ, а саме: порушення насосної, систолічної та діастолічної функцій серця, а також порушення параметрів попереднього навантаження та післянавантаження. Ці висновки підтверджуються значними морфологічними модифікаціями, включаючи фіброз ЛШ. Наявні ознаки серцевої недостатності та ремоделювання серця супроводжуються змінами експресії прогіпертрофічних, сигнальних, структурних білків та мікроРНК. На цій підставі тривалу хронічну 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.

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 спостерігалось 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.

Список використаних джерел

- [1] M. Nichols, N. Townsend, P. Scarborough, i M. Rayner, «Trends in age-specific coronary heart disease mortality in the European Union over three decades: 1980–2009», *Eur. Heart J.*, вип. 34, вип. 39, с. 3017–3027, Жов 2013, doi: 10.1093/eurheartj/eh159.
- [2] M. I. Schmidt *et al.*, «Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges», *The Lancet*, вип. 377, вип. 9781, с. 1949–1961, Чер 2011, doi: 10.1016/S0140-6736(11)60135-9.
- [3] C. J. L. Murray *et al.*, «Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010», *The Lancet*, вип. 380, вип. 9859, с. 2197–2223, Груд 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(12)61689-4.
- [4] B. Ziaeian i G. C. Fonarow, «Epidemiology and aetiology of heart failure», *Nat. Rev. Cardiol.*, вип. 13, вип. 6, с. 368–378, Чер 2016, doi: 10.1038/nrcardio.2016.25.
- [5] S. Allender, P. Scarborough, M. O’Flaherty, i S. Capewell, «Patterns of coronary heart disease mortality over the 20th century in England and Wales: Possible plateaus in the rate of decline», *BMC Public Health*, вип. 8, вип. 1, с. 148, Груд 2008, doi: 10.1186/1471-2458-8-148.
- [6] R. Collins *et al.*, «Blood pressure, stroke, and coronary heart disease», *The Lancet*, вип. 335, вип. 8693, с. 827–838, Квіт 1990, doi: 10.1016/0140-6736(90)90944-Z.
- [7] K. Dudas, G. Lappas, S. Stewart, i A. Rosengren, «Trends in Out-of-Hospital Deaths Due to Coronary Heart Disease in Sweden (1991 to 2006)», *Circulation*, вип. 123, вип. 1, с. 46–52, Січ 2011, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.964999.
- [8] «Efficacy and safety of LDL-lowering therapy among men and women: meta-analysis of individual data from 174 000 participants in 27 randomised trials», *The Lancet*, вип. 385, вип. 9976, с. 1397–1405, Квіт 2015, doi: 10.1016/S0140-6736(14)61368-4.
- [9] I. Shiojima, «Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure», *J. Clin. Invest.*, вип. 115, вип. 8, с. 2108–2118, Сер 2005, doi: 10.1172/JCI24682.
- [10] R. De Boer, Y. Pinto, i D. Van Veldhuisen, «The Imbalance Between Oxygen Demand and Supply as a Potential Mechanism in the Pathophysiology of Heart Failure: The Role of Microvascular Growth and Abnormalities», *Microcirculation*, вип. 10, вип. 2, с. 113–126, Квіт 2003, doi: 10.1080/713773607.
- [11] K. C. Koskinas *et al.*, «Changes of coronary plaque composition correlate with C-reactive protein levels in patients with ST-elevation myocardial infarction following high-intensity statin therapy», *Atherosclerosis*, вип. 247, с. 154–160, Квіт 2016, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.02.015.
- [12] W. Nadruz, «Myocardial remodeling in hypertension», *J. Hum. Hypertens.*, вип. 29, вип. 1, с. 1–6, Січ 2015, doi: 10.1038/jhh.2014.36.
- [13] V. K. Topkara *et al.*, «Therapeutic targeting of innate immunity in the failing heart», *J. Mol. Cell. Cardiol.*, вип. 51, вип. 4, с. 594–599, Жов 2011, doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.11.003.
- [14] S. Epelman *et al.*, «Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation», *Immunity*, вип. 40, вип. 1, с. 91–104, Січ 2014, doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.019.
- [15] I. Valiente-Alandi, A. E. Schafer, i B. C. Blaxall, «Extracellular matrix-mediated cellular communication in the heart», *J. Mol. Cell. Cardiol.*, вип. 91, с. 228–237, Лют 2016, doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.01.011.
- [16] W. Hort, «Growth of the heart in health and disease edited by Radovan Zak Raven Press, New York (1984) 480 pages, illustrated, \$79.00 ISBN: 0-89004-734-0», *Clin. Cardiol.*, вип. 8, вип. 3, с. 186–186, Бер 1985, doi: 10.1002/clc.4960080313.

- [17] R. S. Velagaleti *et al.*, «Relations of Biomarkers Representing Distinct Biological Pathways to Left Ventricular Geometry», *Circulation*, вип. 118, вип. 22, с. 2252–2258, Лис 2008, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.817411.
- [18] R. S. Velagaleti *et al.*, «Left Ventricular Hypertrophy Patterns and Incidence of Heart Failure With Preserved Versus Reduced Ejection Fraction», *Am. J. Cardiol.*, вип. 113, вип. 1, с. 117–122, Січ 2014, doi: 10.1016/j.amjcard.2013.09.028.
- [19] P. Verdecchia *et al.*, «Echocardiographic left ventricular hypertrophy in hypertension: marker for future events or mediator of events?», *Curr. Opin. Cardiol.*, вип. 22, вип. 4, с. 329–334, Лип 2007, doi: 10.1097/HCO.0b013e3280ebb413.
- [20] E. D. Frohlich *et al.*, «The Heart in Hypertension», *N. Engl. J. Med.*, вип. 327, вип. 14, с. 998–1008, Жов 1992, doi: 10.1056/NEJM199210013271406.
- [21] M. Maillet, J. H. van Berlo, i J. D. Molkentin, «Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, вип. 14, вип. 1, с. 38–48, Січ 2013, doi: 10.1038/nrm3495.
- [22] P. H. Sugden i A. Clerk, «Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy», *J. Mol. Med.*, вип. 76, вип. 11, с. 725–746, Бер 1998, doi: 10.1007/s001090050275.
- [23] X. Wei, X. Liu, i A. Rosenzweig, «What do we know about the cardiac benefits of exercise?», *Trends Cardiovasc. Med.*, вип. 25, вип. 6, с. 529–536, Сер 2015, doi: 10.1016/j.tcm.2014.12.014.
- [24] D. Lee *et al.*, «Long-Term Effects of Changes in Cardiorespiratory Fitness and Body Mass Index on All-Cause and Cardiovascular Disease Mortality in Men: The Aerobics Center Longitudinal Study», *Circulation*, вип. 124, вип. 23, с. 2483–2490, Груд 2011, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.038422.
- [25] J. R. McMullen i G. L. Jennings, «Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure», *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, вип. 34, вип. 4, с. 255–262, Квіт 2007, doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04585.x.
- [26] M. H. Soonpaa, K. K. Kim, L. Pajak, M. Franklin, i L. J. Field, «Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development», *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, вип. 271, вип. 5, с. H2183–H2189, Лис 1996, doi: 10.1152/ajpheart.1996.271.5.H2183.
- [27] J. R. McMullen *et al.*, «Phosphoinositide 3-kinase(p110) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, вип. 100, вип. 21, с. 12355–12360, Жов 2003, doi: 10.1073/pnas.1934654100.
- [28] B. C. Bernardo, K. L. Weeks, L. Pretorius, i J. R. McMullen, «Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies», *Pharmacol. Ther.*, вип. 128, вип. 1, с. 191–227, Жов 2010, doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.04.005.
- [29] K. T. Weber, C. G. Brilla, i J. S. Janicki, «Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors», *Cardiovasc. Res.*, вип. 27, вип. 3, с. 341–348, Бер 1993, doi: 10.1093/cvr/27.3.341.
- [30] O. Hudlicka, M. Brown, i S. Egginton, «Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle», *Physiol. Rev.*, вип. 72, вип. 2, с. 369–417, Квіт 1992, doi: 10.1152/physrev.1992.72.2.369.
- [31] J. N. Cohn *et al.*, «Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Special Emphasis Panel on Heart Failure Research», *Circulation*, вип. 95, вип. 4, с. 766–770, Лют 1997, doi: 10.1161/01.CIR.95.4.766.
- [32] R. H. Fagard, «IMPACT OF DIFFERENT SPORTS AND TRAINING ON CARDIAC STRUCTURE AND FUNCTION», *Cardiol. Clin.*, вип. 15, вип. 3, с. 397–412, Сер 1997, doi: 10.1016/S0733-8651(05)70348-9.

- [33] W. R. MacLellan i M. D. Schneider, «Genetic Dissection of Cardiac Growth Control Pathways», *Annu. Rev. Physiol.*, вип. 62, вип. 1, с. 289–320, Бер 2000, doi: 10.1146/annurev.physiol.62.1.289.
- [34] J.-M. Sun *et al.*, «Reduction of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and modulation of myocardial connexin43 by a KATP channel agonist», *Mol. Med. Rep.*, вип. 11, вип. 3, с. 1845–1850, Бер 2015, doi: 10.3892/mmr.2014.2988.
- [35] R. Liu, H.-B. Zhang, J. Yang, J.-R. Wang, J.-X. Liu, i C.-L. Li, «Curcumin alleviates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and fibrosis through inhibition of autophagy and activation of mTOR», *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, вип. 22, вип. 21, с. 7500–7508, 2018, doi: 10.26355/eurrev_201811_16291.
- [36] D. Morales, T. Hermosilla, i D. Varela, «Calcium-dependent inactivation controls cardiac L-type Ca^{2+} currents under β -adrenergic stimulation», *J. Gen. Physiol.*, вип. 151, вип. 6, с. 786–797, Чеп 2019, doi: 10.1085/jgp.201812236.
- [37] Z. Nichtova, M. Novotova, E. Kralova, i T. Stankovicova, «Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol», *Gen. Physiol. Biophys.*, вип. 31, вип. 02, с. 141–151, 2012, doi: 10.4149/gpb_2012_015.
- [38] W. Wallis, M. Cooklin, D. J. Sheridan, i C. H. Fry, «The Action of Isoprenaline on the Electrophysiological Properties of Hypertrophied Left Ventricular Myocytes», *Arch. Physiol. Biochem.*, вип. 109, вип. 2, с. 117–126, Січ 2001, doi: 10.1076/apab.109.2.117.4266.
- [39] I. J. Benjamin, J. E. Jalil, L. B. Tan, K. Cho, K. T. Weber, i W. A. Clark, «Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis.», *Circ. Res.*, вип. 65, вип. 3, с. 657–670, Бер 1989, doi: 10.1161/01.RES.65.3.657.
- [40] E. L. Alderman i D. C. Harrison, «Myocardial Hypertrophy Resulting from Low Dosage Isoproterenol Administration in Rats», *Exp. Biol. Med.*, вип. 136, вип. 1, с. 268–270, Січ 1971, doi: 10.3181/00379727-136-35243.
- [41] R. K. Kudej *et al.*, «Effects of Chronic β -Adrenergic Receptor Stimulation in Mice», *J. Mol. Cell. Cardiol.*, вип. 29, вип. 10, с. 2735–2746, Жов 1997, doi: 10.1006/jmcc.1997.0508.
- [42] Y. Hori, K. Yoshioka, K. Kanai, F. Hoshi, N. Itoh, i S. Higuchi, «Spironolactone Decreases Isoproterenol-Induced Ventricular Fibrosis and Matrix Metalloproteinase-2 in Rats», *Biol. Pharm. Bull.*, вип. 34, вип. 1, с. 61–65, 2011, doi: 10.1248/bpb.34.61.
- [43] T. Petley, K. Graff, W. Jiang, H. Yang, i J. Florini*, «Variation Among Cell Types in the Signaling Pathways by which IGF-I Stimulates Specific Cellular Responses*», *Horm. Metab. Res.*, вип. 31, вип. 02/03, с. 70–76, Січ 1999, doi: 10.1055/s-2007-978701.
- [44] M. Párrizas, A. R. Saltiel, i D. LeRoith, «Insulin-like Growth Factor 1 Inhibits Apoptosis Using the Phosphatidylinositol 3'-Kinase and Mitogen-activated Protein Kinase Pathways», *J. Biol. Chem.*, вип. 272, вип. 1, с. 154–161, Січ 1997, doi: 10.1074/jbc.272.1.154.
- [45] J. Ren, W. K. Samson, i J. R. Sowers, «Insulin-like Growth Factor I as a Cardiac Hormone: Physiological and Pathophysiological Implications in Heart Disease», *J. Mol. Cell. Cardiol.*, вип. 31, вип. 11, с. 2049–2061, Лис 1999, doi: 10.1006/jmcc.1999.1036.
- [46] W. Wu *et al.*, «Expression of Constitutively Active Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibits Activation of Caspase 3 and Apoptosis of Cardiac Muscle Cells», *J. Biol. Chem.*, вип. 275, вип. 51, с. 40113–40119, Груд 2000, doi: 10.1074/jbc.M004108200.
- [47] T. Liu, H. Lai, W. Wu, S. Chinn, i P. H. Wang, «Developing a Strategy to Define the Effects of Insulin-Like Growth Factor-1 on Gene Expression Profile in Cardiomyocytes», *Circ. Res.*, вип. 88, вип. 12, с. 1231–1238, Чеп 2001, doi: 10.1161/hh1201.092036.
- [48] X. Dolcet, J. Egea, R. M. Soler, D. Martin-Zanca, i J. X. Comella, «Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase, but Not Extracellular-Regulated Kinases, Is Necessary to Mediate Brain-Derived Neurotrophic Factor-Induced Motoneuron Survival», *J. Neurochem.*, вип. 73, вип. 2, с. 521–531, Січ 2002, doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0730521.x.

- [49] K. Schlüter, «Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation in the hypertrophic growth of adult ventricular cardiomyocytes», *Cardiovasc. Res.*, вип. 40, вип. 1, с. 174–181, Жов 1998, doi: 10.1016/S0008-6363(98)00171-0.
- [50] G. Y. Oudit *et al.*, «Phosphoinositide 3-Kinase γ -Deficient Mice Are Protected From Isoproterenol-Induced Heart Failure», *Circulation*, вип. 108, вип. 17, с. 2147–2152, Жов 2003, doi: 10.1161/01.CIR.0000091403.62293.2B.
- [51] J. Kim *et al.*, «Insulin-Like Growth Factor I Receptor Signaling Is Required for Exercise-Induced Cardiac Hypertrophy», *Mol. Endocrinol.*, вип. 22, вип. 11, с. 2531–2543, Лис 2008, doi: 10.1210/me.2008-0265.
- [52] J. R. McMullen *et al.*, «The Insulin-like Growth Factor 1 Receptor Induces Physiological Heart Growth via the Phosphoinositide 3-Kinase(p110 α) Pathway», *J. Biol. Chem.*, вип. 279, вип. 6, с. 4782–4793, Лют 2004, doi: 10.1074/jbc.M310405200.
- [53] T. Shioi, «The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice», *EMBO J.*, вип. 19, вип. 11, с. 2537–2548, Чер 2000, doi: 10.1093/emboj/19.11.2537.
- [54] J. Luo *et al.*, «Class IA Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Heart Size and Physiological Cardiac Hypertrophy», *Mol. Cell. Biol.*, вип. 25, вип. 21, с. 9491–9502, Лис 2005, doi: 10.1128/MCB.25.21.9491-9502.2005.
- [55] J. C. Bowman, S. F. Steinberg, T. Jiang, D. L. Geenen, G. I. Fishman, i P. M. Buttrick, «Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates.», *J. Clin. Invest.*, вип. 100, вип. 9, с. 2189–2195, Лис 1997, doi: 10.1172/JCI119755.
- [56] H. S. Hahn *et al.*, «Protein Kinase C α Negatively Regulates Systolic and Diastolic Function in Pathological Hypertrophy», *Circ. Res.*, вип. 93, вип. 11, с. 1111–1119, Лис 2003, doi: 10.1161/01.RES.0000105087.79373.17.
- [57] T. Shioi *et al.*, «Rapamycin Attenuates Load-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice», *Circulation*, вип. 107, вип. 12, с. 1664–1670, Квіт 2003, doi: 10.1161/01.CIR.0000057979.36322.88.
- [58] J. R. McMullen *et al.*, «Inhibition of mTOR Signaling With Rapamycin Regresses Established Cardiac Hypertrophy Induced by Pressure Overload», *Circulation*, вип. 109, вип. 24, с. 3050–3055, Чер 2004, doi: 10.1161/01.CIR.0000130641.08705.45.
- [59] R. Foncea *et al.*, «Insulin-like Growth Factor-I Rapidly Activates Multiple Signal Transduction Pathways in Cultured Rat Cardiac Myocytes», *J. Biol. Chem.*, вип. 272, вип. 31, с. 19115–19124, Сер 1997, doi: 10.1074/jbc.272.31.19115.
- [60] Y. Fujio, T. Nguyen, D. Wencker, R. N. Kitsis, i K. Walsh, «Akt Promotes Survival of Cardiomyocytes In Vitro and Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury in Mouse Heart», *Circulation*, вип. 101, вип. 6, с. 660–667, Лют 2000, doi: 10.1161/01.CIR.101.6.660.
- [61] E. Rinderknecht i R. E. Humbel, «Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II.», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, вип. 73, вип. 7, с. 2365–2369, Лип 1976, doi: 10.1073/pnas.73.7.2365.
- [62] Z. Laron, «Somatomedin-1 (Recombinant Insulin-Like Growth Factor-1): Clinical Pharmacology and Potential Treatment of Endocrine and Metabolic Disorders», *BioDrugs*, вип. 11, вип. 1, с. 55–70, 1999, doi: 10.2165/00063030-199911010-00006.
- [63] B. Klinger, L. T. Jensen, A. Silbergeld, i Z. Laron, «**Insulin-like growth factor-I raises serum procollagen levels in children and adults with Laron syndrome**», *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, вип. 45, вип. 4, с. 423–429, Жов 1996, doi: 10.1046/j.1365-2265.1996.7990809.x.
- [64] G. G. Neri Serneri *et al.*, «Increased Cardiac Sympathetic Activity and Insulin-Like Growth Factor-I Formation Are Associated With Physiological Hypertrophy in Athletes», *Circ. Res.*, вип. 89, вип. 11, с. 977–982, Лис 2001, doi: 10.1161/hh2301.100982.

- [65] A. Zebrowska, Z. Gąsior, i J. Langfort, «Serum IGF-I and hormonal responses to incremental exercise in athletes with and without left ventricular hypertrophy», *J. Sports Sci. Med.*, вип. 8, вип. 1, с. 67–76, 2009.
- [66] E. Rinderknecht i R. E. Humbel, «The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin», *J. Biol. Chem.*, вип. 253, вип. 8, с. 2769–2776, Квіт 1978.
- [67] A. Tadevosyan, G. Vaniotis, B. G. Allen, T. E. Hébert, i S. Nattel, «G protein-coupled receptor signalling in the cardiac nuclear membrane: evidence and possible roles in physiological and pathophysiological function: GPCR signalling in the nuclear membrane», *J. Physiol.*, вип. 590, вип. 6, с. 1313–1330, Бер 2012, doi: 10.1113/jphysiol.2011.222794.
- [68] C. A. Bondy, H. Werner, C. T. Roberts, i D. LeRoith, «Cellular Pattern of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) and Type I IGF Receptor Gene Expression in Early Organogenesis: Comparison with IGF-II Gene Expression», *Mol. Endocrinol.*, вип. 4, вип. 9, с. 1386–1398, Бер 1990, doi: 10.1210/mend-4-9-1386.
- [69] A. C. Moses, S. C. Young, L. A. Morrow, M. O'Brien, i D. R. Clemmons, «Recombinant Human Insulin-Like Growth Factor I Increases Insulin Sensitivity and Improves Glycemic Control in Type II Diabetes», *Diabetes*, вип. 45, вип. 1, с. 91–100, Січ 1996, doi: 10.2337/diab.45.1.91.
- [70] M. S. Sandhu, A. H. Heald, J. M. Gibson, J. K. Cruickshank, D. B. Dunger, i N. J. Wareham, «Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance: a prospective observational study», *The Lancet*, вип. 359, вип. 9319, с. 1740–1745, Трав 2002, doi: 10.1016/S0140-6736(02)08655-5.
- [71] L. Nigi *et al.*, «MicroRNAs as Regulators of Insulin Signaling: Research Updates and Potential Therapeutic Perspectives in Type 2 Diabetes», *Int. J. Mol. Sci.*, вип. 19, вип. 12, с. 3705, Лис 2018, doi: 10.3390/ijms19123705.
- [72] M. G. Myers i M. F. White, «Insulin Signal Transduction and the IRS Proteins», *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, вип. 36, вип. 1, с. 615–658, Квіт 1996, doi: 10.1146/annurev.pa.36.040196.003151.
- [73] P. Eerligh, B. O. Roep, M. J. Giphart, i B. P. C. Koeleman, «Insulin-like growth factor 1 promoter polymorphism influences insulin gene variable number of tandem repeat-associated risk for juvenile onset type 1 diabetes», *Tissue Antigens*, вип. 63, вип. 6, с. 568–571, Чер 2004, doi: 10.1111/j.0001-2815.2004.00229.x.
- [74] A. M. Fernandez, «Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes», *Genes Dev.*, вип. 15, вип. 15, с. 1926–1934, Сер 2001, doi: 10.1101/gad.908001.
- [75] L. Elia *et al.*, «Reciprocal Regulation of MicroRNA-1 and Insulin-Like Growth Factor-1 Signal Transduction Cascade in Cardiac and Skeletal Muscle in Physiological and Pathological Conditions», *Circulation*, вип. 120, вип. 23, с. 2377–2385, Груд 2009, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.879429.
- [76] K. B. Andersson *et al.*, «Moderate heart dysfunction in mice with inducible cardiomyocyte-specific excision of the Serca2 gene», *J. Mol. Cell. Cardiol.*, вип. 47, вип. 2, с. 180–187, Сер 2009, doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.03.013.
- [77] A. W. Trafford, W. J. Lederer, i E. A. Sobie, «Keeping the beat: Life without SERCA — Is it possible?», *J. Mol. Cell. Cardiol.*, вип. 47, вип. 2, с. 171–173, Сер 2009, doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.05.005.
- [78] S. Dally, E. Corvazier, R. Bredoux, R. Bobe, i J. Enouf, «Multiple and diverse coexpression, location, and regulation of additional SERCA2 and SERCA3 isoforms in nonfailing and failing human heart», *J. Mol. Cell. Cardiol.*, вип. 48, вип. 4, с. 633–644, Квіт 2010, doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.11.012.

- [79] S. Dally *et al.*, «Compartmentalized expression of three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺+ATPase 3 isoforms including the switch to ER stress, SERCA3f, in non-failing and failing human heart», *Cell Calcium*, вип. 45, вип. 2, с. 144–154, Лют 2009, doi: 10.1016/j.ceca.2008.08.002.
- [80] C. Chaâbane *et al.*, «Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺+ATPase type 3 isoforms (SERCA3b and SERCA3f): Distinct roles in cell adhesion and ER stress», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, вип. 345, вип. 4, с. 1377–1385, Лип 2006, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.05.054.
- [81] M. Liu і S. Dudley, «Role for the Unfolded Protein Response in Heart Disease and Cardiac Arrhythmias», *Int. J. Mol. Sci.*, вип. 17, вип. 1, с. 52, Груд 2015, doi: 10.3390/ijms17010052.
- [82] C. Zhang *et al.*, «Unfolded protein response plays a critical role in heart damage after myocardial ischemia/reperfusion in rats», *PLOS ONE*, вип. 12, вип. 6, с. e0179042, Чер 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0179042.
- [83] D.-R. Ji і Y.-F. Qi, «[New research advances in relationship of endoplasmic reticulum stress and cardiovascular diseases]», *Sheng Li Xue Bao*, вип. 72, вип. 2, с. 190–204, Квіт 2020.
- [84] S. Hernandez-Resendiz, F. Prunier, H. Girao, G. Dorn, D. J. Hausenloy, і EU-CARDIOPROTECTION COST Action (CA16225), «Targeting mitochondrial fusion and fission proteins for cardioprotection», *J. Cell. Mol. Med.*, вип. 24, вип. 12, с. 6571–6585, Чер 2020, doi: 10.1111/jcmm.15384.
- [85] M. Rodriguez, W. Cai, S. Kostin, B. Lucchesi, і J. Schaper, «Ischemia depletes dystrophin and inhibits protein synthesis in the canine heart: Mechanisms of myocardial ischemic injury», *J. Mol. Cell. Cardiol.*, вип. 38, вип. 5, с. 723–733, Трав 2005, doi: 10.1016/j.yjmcc.2005.02.019.
- [86] S. Kyoі *et al.*, «Dystrophin is a possible end-target of ischemic preconditioning against cardiomyocyte oncosis during the early phase of reperfusion», *Cardiovasc. Res.*, вип. 70, вип. 2, с. 354–363, Трав 2006, doi: 10.1016/j.cardiores.2006.01.004.
- [87] L. Khouzami *et al.*, «Delayed Cardiomyopathy in Dystrophin Deficient mdx Mice Relies on Intrinsic Glutathione Resource», *Am. J. Pathol.*, вип. 177, вип. 3, с. 1356–1364, Вер 2010, doi: 10.2353/ajpath.2010.090479.
- [88] T. Daicho *et al.*, «Alterations in Dystrophin-Related Glycoproteins in Development of Right Ventricular Failure in Rats», *J. Pharmacol. Sci.*, вип. 111, вип. 4, с. 405–415, 2009, doi: 10.1254/jphs.09208FP.
- [89] J. Romo-Yáñez *et al.*, «Characterization of the expression of dystrophins and dystrophin-associated proteins during embryonic neural stem/progenitor cell differentiation», *Neurosci. Lett.*, с. 135247, Лип 2020, doi: 10.1016/j.neulet.2020.135247.
- [90] D. Townsend, S. Yasuda, E. McNally, і J. M. Metzger, «Distinct pathophysiological mechanisms of cardiomyopathy in hearts lacking dystrophin or the sarcoglycan complex», *FASEB J.*, вип. 25, вип. 9, с. 3106–3114, Вер 2011, doi: 10.1096/fj.10-178913.
- [91] F. Han *et al.*, «Inhibition of Dystrophin Breakdown and Endothelial Nitric-Oxide Synthase Uncoupling Accounts for Cytoprotection by 3-[2-[4-(3-Chloro-2-methylphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-5,6-dimethoxy-1-(4-imidazolylmethyl)-1 H -indazole Dihydrochloride 3.5 Hydrate (DY-9760e) in Left Ventricular Hypertrophied Mice», *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, вип. 332, вип. 2, с. 421–428, Лют 2010, doi: 10.1124/jpet.109.161646.
- [92] Md. S. Bhuiyan, N. Shioda, M. Shibuya, Y. Iwabuchi, і K. Fukunaga, «Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by a Vanadium Compound Ameliorates Pressure Overload-Induced Cardiac Injury in Ovariectomized Rats», *Hypertension*, вип. 53, вип. 1, с. 57–63, Січ 2009, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.118356.
- [93] Y.-M. Lu *et al.*, «Imbalance between CaM kinase II and calcineurin activities impairs caffeine-induced calcium release in hypertrophic cardiomyocytes», *Biochem. Pharmacol.*, вип. 74, вип. 12, с. 1727–1737, Груд 2007, doi: 10.1016/j.bcp.2007.08.022.

- [94] J. Finsterer i C. Stöllberger, «The Heart in Human Dystrophinopathies», *Cardiology*, вип. 99, вип. 1, с. 1–19, 2003, doi: 10.1159/000068446.
- [95] A. Romfh i E. M. McNally, «Cardiac Assessment in Duchenne and Becker Muscular Dystrophies», *Curr. Heart Fail. Rep.*, вип. 7, вип. 4, с. 212–218, Груд 2010, doi: 10.1007/s11897-010-0028-2.
- [96] N. de Jonge *et al.*, «Controlling cardiomyocyte survival», *Novartis Found. Symp.*, вип. 274, с. 41–51; discussion 51-57, 152–155, 272–276, 2006.
- [97] D. Kumar, H. Lou, i P. K. Singal, «Oxidative stress and apoptosis in heart dysfunction», *Herz*, вип. 27, вип. 7, с. 662–668, Лис 2002, doi: 10.1007/s00059-002-2430-3.
- [98] T. Matsui, T. Nagoshi, i A. Rosenzweig, «Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival», *Cell Cycle Georget. Tex.*, вип. 2, вип. 3, с. 220–223, Чер 2003.
- [99] T. Matsui i A. Rosenzweig, «Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt», *J. Mol. Cell. Cardiol.*, вип. 38, вип. 1, с. 63–71, Січ 2005, doi: 10.1016/j.yjmcc.2004.11.005.
- [100] T. Matsui *et al.*, «Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo», *Circulation*, вип. 104, вип. 3, с. 330–335, Лип 2001, doi: 10.1161/01.cir.104.3.330.
- [101] B. S. McGowan, E. F. Ciccimaro, T. O. Chan, i A. M. Feldman, «The balance between pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways in the failing myocardium», *Cardiovasc. Toxicol.*, вип. 3, вип. 3, с. 191–206, 2003, doi: 10.1385/ct.3:3:191.
- [102] G. Y. Oudit i J. M. Penninger, «Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN», *Cardiovasc. Res.*, вип. 82, вип. 2, с. 250–260, Трав 2009, doi: 10.1093/cvr/cvp014.
- [103] S. C. Armstrong, «Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury», *Cardiovasc. Res.*, вип. 61, вип. 3, с. 427–436, Лют 2004, doi: 10.1016/j.cardiores.2003.09.031.
- [104] M. Ceci *et al.*, «Cardiac-specific overexpression of E40K active Akt prevents pressure overload-induced heart failure in mice by increasing angiogenesis and reducing apoptosis», *Cell Death Differ.*, вип. 14, вип. 5, с. 1060–1062, Трав 2007, doi: 10.1038/sj.cdd.4402095.
- [105] R. Aikawa *et al.*, «Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt», *Circulation*, вип. 102, вип. 23, с. 2873–2879, Груд 2000, doi: 10.1161/01.cir.102.23.2873.
- [106] R. Ananthakrishnan, G. W. Moe, M. J. Goldenthal, i J. Marín-García, «Akt signaling pathway in pacing-induced heart failure», *Mol. Cell. Biochem.*, вип. 268, вип. 1–2, с. 103–110, Січ 2005, doi: 10.1007/s11010-005-3699-3.
- [107] M. Esfandiarei, S. Boroomand, A. Suarez, X. Si, M. Rahmani, i B. McManus, «Coxsackievirus B3 activates nuclear factor kappa B transcription factor via a phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B-dependent pathway to improve host cell viability», *Cell. Microbiol.*, вип. 9, вип. 10, с. 2358–2371, Жов 2007, doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00964.x.
- [108] M. Esfandiarei *et al.*, «Protein kinase B/Akt regulates coxsackievirus B3 replication through a mechanism which is not caspase dependent», *J. Virol.*, вип. 78, вип. 8, с. 4289–4298, Квіт 2004, doi: 10.1128/jvi.78.8.4289-4298.2004.
- [109] M. Esfandiarei *et al.*, «Novel role for integrin-linked kinase in modulation of coxsackievirus B3 replication and virus-induced cardiomyocyte injury», *Circ. Res.*, вип. 99, вип. 4, с. 354–361, Сер 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000237022.72726.01.
- [110] J. Heineke i J. D. Molkentin, «Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, вип. 7, вип. 8, с. 589–600, Сер 2006, doi: 10.1038/nrm1983.

- [111] T. Ha *et al.*, «Attenuation of cardiac hypertrophy by inhibiting both mTOR and NFκB activation in vivo», *Free Radic. Biol. Med.*, вип. 39, вип. 12, с. 1570–1580, Груд 2005, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.002.
- [112] A. M. D. Gonzalez, J. C. Osorio, C. Manlhiot, D. Gruber, S. Homma, i S. Mital, «Hypertrophy signaling during peripartum cardiac remodeling», *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, вип. 293, вип. 5, с. H3008-3013, Лис 2007, doi: 10.1152/ajpheart.00401.2007.
- [113] E. Hiraoka *et al.*, «TNF-alpha induces protein synthesis through PI3-kinase-Akt/PKB pathway in cardiac myocytes», *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, вип. 280, вип. 4, с. H1861-1868, Квіт 2001, doi: 10.1152/ajpheart.2001.280.4.H1861.
- [114] F. Furuya, C. Lu, C. J. Guigon, i S.-Y. Cheng, «Nongenomic activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by thyroid hormone receptors», *Steroids*, вип. 74, вип. 7, с. 628–634, Лип 2009, doi: 10.1016/j.steroids.2008.10.009.
- [115] A. Kenessey i K. Ojamaa, «Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways», *J. Biol. Chem.*, вип. 281, вип. 30, с. 20666–20672, Лип 2006, doi: 10.1074/jbc.M512671200.
- [116] O. J. Kemi *et al.*, «Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy», *J. Cell. Physiol.*, вип. 214, вип. 2, с. 316–321, Лют 2008, doi: 10.1002/jcp.21197.
- [117] C. Skurk *et al.*, «The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling», *J. Biol. Chem.*, вип. 280, вип. 21, с. 20814–20823, Трав 2005, doi: 10.1074/jbc.M500528200.
- [118] H.-H. Li *et al.*, «Atrogin-1 inhibits Akt-dependent cardiac hypertrophy in mice via ubiquitin-dependent coactivation of Forkhead proteins», *J. Clin. Invest.*, вип. 117, вип. 11, с. 3211–3223, Лис 2007, doi: 10.1172/JCI31757.
- [119] T. Nagoshi *et al.*, «PI3K rescues the detrimental effects of chronic Akt activation in the heart during ischemia/reperfusion injury», *J. Clin. Invest.*, вип. 115, вип. 8, с. 2128–2138, Сер 2005, doi: 10.1172/JCI23073.
- [120] M. Rubio *et al.*, «Cardioprotective stimuli mediate phosphoinositide 3-kinase and phosphoinositide dependent kinase 1 nuclear accumulation in cardiomyocytes», *J. Mol. Cell. Cardiol.*, вип. 47, вип. 1, с. 96–103, Лип 2009, doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.02.022.
- [121] I. Shiraishi *et al.*, «Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes», *Circ. Res.*, вип. 94, вип. 7, с. 884–891, Квіт 2004, doi: 10.1161/01.RES.0000124394.01180.BE.
- [122] P. Kaminker, «Is Akt the mastermind behind age-related heart disease?», *Sci. Aging Knowl. Environ. SAGE KE*, вип. 2004, вип. 8, с. pe8, Лют 2004, doi: 10.1126/sageke.2004.8.pe8.
- [123] C. Diez *et al.*, «Down-regulation of Akt/PKB in senescent cardiac fibroblasts impairs PDGF-induced cell proliferation», *Cardiovasc. Res.*, вип. 49, вип. 4, с. 731–740, Бер 2001, doi: 10.1016/s0008-6363(00)00296-0.
- [124] C. X. Fang, F. Dong, B. H. Ren, P. N. Epstein, i J. Ren, «Metallothionein alleviates cardiac contractile dysfunction induced by insulin resistance: role of Akt phosphorylation, PTB1B, PPARgamma and c-Jun», *Diabetologia*, вип. 48, вип. 11, с. 2412–2421, Лис 2005, doi: 10.1007/s00125-005-1940-y.
- [125] C. X. Fang, T. A. Doser, X. Yang, N. Sreejayan, i J. Ren, «Metallothionein antagonizes aging-induced cardiac contractile dysfunction: role of PTP1B, insulin receptor tyrosine phosphorylation and Akt», *Aging Cell*, вип. 5, вип. 2, с. 177–185, Квіт 2006, doi: 10.1111/j.1474-9726.2006.00201.x.
- [126] M. Iemitsu, S. Maeda, S. Jesmin, T. Otsuki, i T. Miyauchi, «Exercise training improves aging-induced downregulation of VEGF angiogenic signaling cascade in hearts», *Am. J. Physiol.*

- Heart Circ. Physiol.*, вип. 291, вип. 3, с. H1290-1298, Бер 2006, doi: 10.1152/ajpheart.00820.2005.
- [127] S. Ikeyama, G. Kokkonen, S. Shack, X.-T. Wang, i N. J. Holbrook, «Loss in oxidative stress tolerance with aging linked to reduced extracellular signal-regulated kinase and Akt kinase activities», *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, вип. 16, вип. 1, с. 114–116, Січ 2002, doi: 10.1096/fj.01-0409fje.
- [128] J. Li *et al.*, «The pro-angiogenic cytokine pleiotrophin potentiates cardiomyocyte apoptosis through inhibition of endogenous AKT/PKB activity», *J. Biol. Chem.*, вип. 282, вип. 48, с. 34984–34993, Лис 2007, doi: 10.1074/jbc.M703513200.
- [129] Y. Li, D. Dowbenko, i L. A. Lasky, «AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival», *J. Biol. Chem.*, вип. 277, вип. 13, с. 11352–11361, Бер 2002, doi: 10.1074/jbc.M109062200.
- [130] N. Fujita, S. Sato, K. Katayama, i T. Tsuruo, «Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization», *J. Biol. Chem.*, вип. 277, вип. 32, с. 28706–28713, Сер 2002, doi: 10.1074/jbc.M203668200.
- [131] Y. Ogawara *et al.*, «Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53», *J. Biol. Chem.*, вип. 277, вип. 24, с. 21843–21850, Чер 2002, doi: 10.1074/jbc.M109745200.
- [132] S. Fujita *et al.*, «Aerobic exercise overcomes the age-related insulin resistance of muscle protein metabolism by improving endothelial function and Akt/mammalian target of rapamycin signaling», *Diabetes*, вип. 56, вип. 6, с. 1615–1622, Чер 2007, doi: 10.2337/db06-1566.
- [133] D. Torella *et al.*, «Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression», *Circ. Res.*, вип. 94, вип. 4, с. 514–524, Бер 2004, doi: 10.1161/01.RES.0000117306.10142.50.
- [134] A. R. Smith i T. M. Hagen, «Vascular endothelial dysfunction in aging: loss of Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and partial restoration by (R)-alpha-lipoic acid», *Biochem. Soc. Trans.*, вип. 31, вип. Pt 6, с. 1447–1449, Груд 2003, doi: 10.1042/bst0311447.
- [135] E. van Rooij *et al.*, «A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, вип. 103, вип. 48, с. 18255–18260, Лис 2006, doi: 10.1073/pnas.0608791103.
- [136] E. van Rooij, L. B. Sutherland, X. Qi, J. A. Richardson, J. Hill, i E. N. Olson, «Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA», *Science*, вип. 316, вип. 5824, с. 575–579, Квіт 2007, doi: 10.1126/science.1139089.
- [137] A. Carè *et al.*, «MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy», *Nat. Med.*, вип. 13, вип. 5, с. 613–618, Трав 2007, doi: 10.1038/nm1582.
- [138] D. Sayed, C. Hong, I.-Y. Chen, J. Lypowy, i M. Abdellatif, «MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy», *Circ. Res.*, вип. 100, вип. 3, с. 416–424, Лют 2007, doi: 10.1161/01.RES.0000257913.42552.23.
- [139] The Cardiolinc network, «Long noncoding RNAs in cardiac development and ageing», *Nat. Rev. Cardiol.*, вип. 12, вип. 7, с. 415–425, Лип 2015, doi: 10.1038/nrcardio.2015.55.
- [140] S. Greco, A. Salgado Somoza, Y. Devaux, i F. Martelli, «Long Noncoding RNAs and Cardiac Disease», *Antioxid. Redox Signal.*, вип. 29, вип. 9, с. 880–901, Бер 2018, doi: 10.1089/ars.2017.7126.
- [141] Y. Bei *et al.*, «Extracellular Vesicles in Cardiovascular Theranostics», *Theranostics*, вип. 7, вип. 17, с. 4168–4182, 2017, doi: 10.7150/thno.21274.
- [142] «Emerging role of non-coding RNAs and extracellular vesicles in cardioprotection by remote ischemic conditioning of the heart», *Rev. Cardiovasc. Med.*, вип. 20, вип. 2, с. 59, 2019, doi: 10.31083/j.rcm.2019.02.54.

- [143] C. P. C. Gomes *et al.*, «The Function and Therapeutic Potential of Long Non-coding RNAs in Cardiovascular Development and Disease», *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, вип. 8, с. 494–507, Бер 2017, doi: 10.1016/j.omtn.2017.07.014.
- [144] L.-A. MacFarlane і P. R. Murphy, «MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer», *Curr. Genomics*, вип. 11, вип. 7, с. 537–561, Лис 2010, doi: 10.2174/138920210793175895.
- [145] T. Sun *et al.*, «The Role of MicroRNAs in Myocardial Infarction: From Molecular Mechanism to Clinical Application», *Int. J. Mol. Sci.*, вип. 18, вип. 4, с. 745, Бер 2017, doi: 10.3390/ijms18040745.
- [146] C. Ruggeri, S. Gioffré, F. Achilli, G. I. Colombo, і Y. D'Alessandra, «Role of microRNAs in doxorubicin-induced cardiotoxicity: an overview of preclinical models and cancer patients», *Heart Fail. Rev.*, вип. 23, вип. 1, с. 109–122, Січ 2018, doi: 10.1007/s10741-017-9653-0.
- [147] L. R. P. Ferreira *et al.*, «MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a and miR-208b are dysregulated in Chronic Chagas disease Cardiomyopathy», *Int. J. Cardiol.*, вип. 175, вип. 3, с. 409–417, Сер 2014, doi: 10.1016/j.ijcard.2014.05.019.
- [148] A. E. Pasquinelli *et al.*, «Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA», *Nature*, вип. 408, вип. 6808, с. 86–89, Лис 2000, doi: 10.1038/35040556.
- [149] G. Condorelli, M. V. G. Latronico, і G. W. Dorn, «microRNAs in heart disease: putative novel therapeutic targets?», *Eur. Heart J.*, вип. 31, вип. 6, с. 649–658, Бер 2010, doi: 10.1093/eurheartj/ehp573.
- [150] P. K. Rao *et al.*, «Loss of Cardiac microRNA-Mediated Regulation Leads to Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure», *Circ. Res.*, вип. 105, вип. 6, с. 585–594, Бер 2009, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.200451.
- [151] Y.-D. Li *et al.*, «Altered expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and microRNA-1 and -133 in patients with age-associated atrial fibrillation», *Mol. Med. Rep.*, вип. 12, вип. 3, с. 3243–3248, Бер 2015, doi: 10.3892/mmr.2015.3831.
- [152] V. Gurianova *et al.*, «Stress response factors as hub-regulators of microRNA biogenesis: implication to the diseased heart: miRNAs and Myocardial Infarction», *Cell Biochem. Funct.*, вип. 33, вип. 8, с. 509–518, Груд 2015, doi: 10.1002/cbf.3151.
- [153] V. Gurianova, D. Stroy, P. Kruzliak, V. Kyrichenko, A. Moibenko, і V. Dosenko, «Does proteasome regulate the level of microRNA-1 in cardiomyocytes? Application to anoxia-reoxygenation», *Mol. Cell. Biochem.*, вип. 404, вип. 1–2, с. 45–51, Чер 2015, doi: 10.1007/s11010-015-2365-7.
- [154] K. Liu, Z. Ying, X. Qi, Y. Shi, і Q. Tang, «MicroRNA-1 regulates the proliferation of vascular smooth muscle cells by targeting insulin-like growth factor 1», *Int. J. Mol. Med.*, вип. 36, вип. 3, с. 817–824, Бер 2015, doi: 10.3892/ijmm.2015.2277.
- [155] M. O. Boluyt, O. H. L. Bing, і E. G. Lakatta, «The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure», *Eur. Heart J.*, вип. 16, вип. suppl N, с. 19–30, Груд 1995, doi: 10.1093/eurheartj/16.suppl_N.19.
- [156] K. G. Barrinhaus і P. D. Zamore, «MicroRNAs: Regulating a Change of Heart», *Circulation*, вип. 119, вип. 16, с. 2217–2224, Квіт 2009, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.715839.
- [157] I. Karakikes *et al.*, «Therapeutic Cardiac-Targeted Delivery of *miR-1* Reverses Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy and Attenuates Pathological Remodeling», *J. Am. Heart Assoc.*, вип. 2, вип. 2, Бер 2013, doi: 10.1161/JAHA.113.000078.
- [158] F. Varrone *et al.*, «The Circulating Level of FABP3 Is an Indirect Biomarker of MicroRNA-1», *J. Am. Coll. Cardiol.*, вип. 61, вип. 1, с. 88–95, Січ 2013, doi: 10.1016/j.jacc.2012.08.1003.

- [159] H. Matsubara, J. Araki, M. Takaki, S. T. Nakagawa, i H. Suga, «Logistic Characterization of Left Ventricular Isovolumic Pressure-Time Curve.», *Jpn. J. Physiol.*, вип. 45, вип. 3, с. 535–552, 1995, doi: 10.2170/jjphysiol.45.535.
- [160] N. Townsend, L. Wilson, P. Bhatnagar, K. Wickramasinghe, M. Rayner, i M. Nichols, «Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016», *Eur. Heart J.*, вип. 37, вип. 42, с. 3232–3245, Лис 2016, doi: 10.1093/eurheartj/ehw334.
- [161] A. B. Jørgensen, R. Frikke-Schmidt, A. S. West, P. Grande, B. G. Nordestgaard, i A. Tybjaerg-Hansen, «Genetically elevated non-fasting triglycerides and calculated remnant cholesterol as causal risk factors for myocardial infarction», *Eur. Heart J.*, вип. 34, вип. 24, с. 1826–1833, Чер 2013, doi: 10.1093/eurheartj/ehs431.
- [162] J. J. Thune *et al.*, «Effect of Antecedent Hypertension and Follow-Up Blood Pressure on Outcomes After High-Risk Myocardial Infarction», *Hypertension*, вип. 51, вип. 1, с. 48–54, Січ 2008, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.093682.
- [163] A. Verma *et al.*, «Prognostic Implications of Left Ventricular Mass and Geometry Following Myocardial Infarction», *JACC Cardiovasc. Imaging*, вип. 1, вип. 5, с. 582–591, Бер 2008, doi: 10.1016/j.jcmg.2008.05.012.
- [164] Y. Kitagawa, D. Yamashita, H. Ito, i M. Takaki, «Reversible effects of isoproterenol-induced hypertrophy on in situ left ventricular function in rat hearts», *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, вип. 287, вип. 1, с. H277–H285, Лип 2004, doi: 10.1152/ajpheart.00073.2004.
- [165] D. Takeshita *et al.*, «Isoproterenol-Induced Hypertrophied Rat Hearts: Does Short-Term Treatment Correspond to Long-Term Treatment?», *J. Physiol. Sci.*, вип. 58, вип. 3, с. 179–188, 2008, doi: 10.2170/physiolsci.RP004508.
- [166] L. C. Heather, A. F. Catchpole, D. J. Stuckey, M. A. Cole, C. A. Carr, i K. Clarke, «Isoproterenol induces in vivo functional and metabolic abnormalities: similar to those found in the infarcted rat heart», *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.*, вип. 60, вип. 3, с. 31–39, Бер 2009.
- [167] I. S. Anand, «Ventricular remodeling without cellular contractile dysfunction», *J. Card. Fail.*, вип. 8, вип. 6, с. S401–S408, Груд 2002, doi: 10.1054/jcaf.2002.129566.
- [168] O. E. Osadchii, «Cardiac hypertrophy induced by sustained β -adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects», *Heart Fail. Rev.*, вип. 12, вип. 1, с. 66–86, Квіт 2007, doi: 10.1007/s10741-007-9007-4.
- [169] C. Nakajima-Takenaka *et al.*, «Left ventricular function of isoproterenol-induced hypertrophied rat hearts perfused with blood: mechanical work and energetics», *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, вип. 297, вип. 5, с. H1736–H1743, Лис 2009, doi: 10.1152/ajpheart.00672.2009.
- [170] O. E. Osadchii, G. R. Norton, R. McKechnie, D. Deftereos, i A. J. Woodiwiss, «Cardiac dilatation and pump dysfunction without intrinsic myocardial systolic failure following chronic β -adrenoreceptor activation», *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, вип. 292, вип. 4, с. H1898–H1905, Квіт 2007, doi: 10.1152/ajpheart.00740.2006.
- [171] H. K. Mørk, I. Sjaastad, J. B. Sande, M. Periasamy, O. M. Sejersted, i W. E. Louch, «Increased cardiomyocyte function and Ca^{2+} transients in mice during early congestive heart failure», *J. Mol. Cell. Cardiol.*, вип. 43, вип. 2, с. 177–186, Чер 2007, doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.05.004.
- [172] E. Soltysinska, S. Thiele, S. P. Olesen, i O. E. Osadchii, «Chronic sympathetic activation promotes downregulation of β -adrenoceptor-mediated effects in the guinea pig heart independently of structural remodeling and systolic dysfunction», *Pflug. Arch. - Eur. J. Physiol.*, вип. 462, вип. 4, с. 529–543, Жов 2011, doi: 10.1007/s00424-011-1005-7.
- [173] K. M. Shioura, D. L. Geenen, i P. H. Goldspink, «Sex-related changes in cardiac function following myocardial infarction in mice», *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.*, вип. 295, вип. 2, с. R528–R534, Чер 2008, doi: 10.1152/ajpregu.90342.2008.

- [174] M. Gibbs *et al.*, «Chronic β -adrenoreceptor activation increases cardiac cavity size through chamber remodeling and not via modifications in myocardial material properties», *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, вип. 287, вип. 6, с. H2762–H2767, Груд 2004, doi: 10.1152/ajpheart.00501.2004.
- [175] М. О. Кuz'menko, V. B. Pavliuchenko, L. V. Tumanovs'ka, V. I. Dosenko, і О. О. Моїбенко, «[Interrelation between cardiac pump function disturbances and cardiac contractility after beta-adrenergic hyperstimulation of the heart in rats]», *Fiziologichnyi Zhurnal Kiev Ukr.* 1994, вип. 57, вип. 2, с. 3–13, 2011.
- [176] A. Anwar, K.-D. Schlüter, J. Heger, H. M. Piper, і G. Euler, «Enhanced SERCA2A expression improves contractile performance of ventricular cardiomyocytes of rat under adrenergic stimulation», *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.*, вип. 457, вип. 2, с. 485–491, Лис 2008, doi: 10.1007/s00424-008-0520-7.
- [177] W. W. Brooks і C. H. Conrad, «Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates», *Comp. Med.*, вип. 59, вип. 4, с. 339–343, Сер 2009.
- [178] Y.-M. Lu *et al.*, «Phenylephrine-Induced Cardiomyocyte Injury Is Triggered by Superoxide Generation through Uncoupled Endothelial Nitric-Oxide Synthase and Ameliorated by 3-[2-[4-(3-Chloro-2-methylphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-5,6-dimethoxyindazole (DY-9836), a Novel Calmodulin Antagonist», *Mol. Pharmacol.*, вип. 75, вип. 1, с. 101–112, Січ 2009, doi: 10.1124/mol.108.050716.
- [179] S. Kimura *et al.*, «A 900 bp genomic region from the mouse dystrophin promoter directs lacZ reporter expression only to the right heart of transgenic mice», *Dev. Growth Differ.*, вип. 39, вип. 3, с. 257–265, Чер 1997, doi: 10.1046/j.1440-169X.1997.t01-2-00001.x.
- [180] N. C. Trippodo і E. D. Frohlich, «Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat.», *Circ. Res.*, вип. 48, вип. 3, с. 309–319, Бер 1981, doi: 10.1161/01.RES.48.3.309.
- [181] Z. Qiu *et al.*, «Rosuvastatin-attenuated heart failure in aged spontaneously hypertensive rats via PKC α / β 2 signal pathway», *J. Cell. Mol. Med.*, вип. 16, вип. 12, с. 3052–3061, Груд 2012, doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01632.x.
- [182] R. L. Castillo *et al.*, «Quercetin Prevents Diastolic Dysfunction Induced by a High-Cholesterol Diet: Role of Oxidative Stress and Bioenergetics in Hyperglycemic Rats», *Oxid. Med. Cell. Longev.*, вип. 2018, с. 1–14, 2018, doi: 10.1155/2018/7239123.
- [183] S. Kapur *et al.*, «Early development of intracellular calcium cycling defects in intact hearts of spontaneously hypertensive rats», *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, вип. 299, вип. 6, с. H1843–H1853, Груд 2010, doi: 10.1152/ajpheart.00623.2010.
- [184] V. Chan, A. Fenning, A. Hoey, і L. Brown, «Chronic β -adrenoceptor Antagonist Treatment Controls Cardiovascular Remodeling in Heart Failure in the Aging Spontaneously Hypertensive Rat», *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, вип. 58, вип. 4, с. 424–431, Жов 2011, doi: 10.1097/FJC.0b013e3182283c78.
- [185] О. Н. Cingolani, X.-P. Yang, M. A. Cavasin, і О. А. Carretero, «Increased Systolic Performance With Diastolic Dysfunction in Adult Spontaneously Hypertensive Rats», *Hypertension*, вип. 41, вип. 2, с. 249–254, Лют 2003, doi: 10.1161/01.HYP.0000052832.96564.0B.
- [186] P. Barbier, S. B. Solomon, N. B. Schiller, і S. A. Glantz, «Left Atrial Relaxation and Left Ventricular Systolic Function Determine Left Atrial Reservoir Function», *Circulation*, вип. 100, вип. 4, с. 427–436, Лип 1999, doi: 10.1161/01.CIR.100.4.427.
- [187] L. Nurmi, H. M. Heikkilä, H. Vapaatalo, P. T. Kovanen, і K. A. Lindstedt, «Downregulation of Bradykinin Type 2 Receptor Expression in Cardiac Endothelial Cells during Senescence», *J. Vasc. Res.*, вип. 49, вип. 1, с. 13–23, 2012, doi: 10.1159/000329615.

- [188] X. Zhou i E. Frohlich, «Analogy of Cardiac and Renal Complications in Essential Hypertension and Aged SHR or L-NAME/SHR», *Med. Chem.*, вип. 3, вип. 1, с. 61–65, Січ 2007, doi: 10.2174/157340607779317634.
- [189] J.-D. Fu *et al.*, «Distinct Roles of MicroRNA-1 and -499 in Ventricular Specification and Functional Maturation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes», *PLoS ONE*, вип. 6, вип. 11, с. e27417, Лис 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0027417.
- [190] D. P. Bartel, «Metazoan MicroRNAs», *Cell*, вип. 173, вип. 1, с. 20–51, Бер 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006.
- [191] L. Duan, X. Xiong, Y. Liu, i J. Wang, «miRNA-1: functional roles and dysregulation in heart disease», *Mol Biosyst*, вип. 10, вип. 11, с. 2775–2782, 2014, doi: 10.1039/C4MB00338A.
- [192] M. Rajabi, C. Kassiotis, P. Razeghi, i H. Taegtmeyer, «Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis», *Heart Fail. Rev.*, вип. 12, вип. 3–4, с. 331–343, Лип 2007, doi: 10.1007/s10741-007-9034-1.
- [193] T. Thum *et al.*, «MicroRNAs in the Human Heart: A Clue to Fetal Gene Reprogramming in Heart Failure», *Circulation*, вип. 116, вип. 3, с. 258–267, Лип 2007, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.687947.
- [194] F. Rau *et al.*, «Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy», *Nat. Struct. Mol. Biol.*, вип. 18, вип. 7, с. 840–845, Лип 2011, doi: 10.1038/nsmb.2067.
- [195] J. R. Buchan i R. Parker, «Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation», *Mol. Cell*, вип. 36, вип. 6, с. 932–941, Груд 2009, doi: 10.1016/j.molcel.2009.11.020.
- [196] J.-F. Chen *et al.*, «The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation», *Nat. Genet.*, вип. 38, вип. 2, с. 228–233, Лют 2006, doi: 10.1038/ng1725.
- [197] I. N. King *et al.*, «The RNA-binding Protein TDP-43 Selectively Disrupts MicroRNA-1/206 Incorporation into the RNA-induced Silencing Complex», *J. Biol. Chem.*, вип. 289, вип. 20, с. 14263–14271, Трав 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.561902.
- [198] A. Emde *et al.*, «Dysregulated mi RNA biogenesis downstream of cellular stress and ALS-causing mutations: a new mechanism for ALS», *EMBO J.*, вип. 34, вип. 21, с. 2633–2651, Лис 2015, doi: 10.15252/embj.201490493.
- [199] Z. Anna *et al.*, «Heart-protective effect of n-3 PUFA demonstrated in a rat model of diabetic cardiomyopathy», *Mol. Cell. Biochem.*, вип. 389, вип. 1–2, с. 219–227, Квіт 2014, doi: 10.1007/s11010-013-1943-9.
- [200] A. Curcio *et al.*, «MicroRNA-1 Downregulation Increases Connexin 43 Displacement and Induces Ventricular Tachyarrhythmias in Rodent Hypertrophic Hearts», *PLoS ONE*, вип. 8, вип. 7, с. e70158, Лип 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0070158.