

Національна Академія Наук України
Інститут молекулярної біології і генетики
03143, м. Київ, вул. Заболотного, 150
Тел. (380-44) 200-03-56

УДК 616.379-008.64:576.31+577.334
№ держреєстрації

«Затверджую»

Директор
Інституту молекулярної біології
і генетики НАН України
академік НАН України

Михайло ТУКАЛО
2021 р.



ЗАКЛЮЧНИЙ ЗВІТ

про науково-дослідну роботу між
Інститутом фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України та
Інститутом молекулярної біології і генетики НАН України

**«Дослідження впливу омега-3 ПНЖК та кверцетину, як
модуляторів експресії PPAR, на рівень експресії генів, що
регулюють патологічні процеси, у міокарді тварин на моделях
розвитку серцевої недостатності та цукрового діабету»**

в межах наукового проєкту № 20220.02/0332
Національного фонду досліджень України
"Підтримка досліджень провідних та молодих учених"

Науковий керівник роботи:
С.н.с., к.б.н., с.н.с. відділу
молекулярної онкогенетики
Оксана МАКСИМЧУК

Рукопис закінчено 13 грудня 2021 року

КИЇВ 2021

СПИСОК АВТОРІВ

Науковий керівник роботи

та основний виконавець



с.н.с. к.б.н. Оксана МАКСИМЧУК

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 46 с., 1 табл., 6 рис., 44 джерела.

ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ, СЕРЦЕВА НЕДОСТАТНІСТЬ, МІОКАРД, *Cyp2e1*, *MYC*, *ILR*, *IL6*, *Col 1*, CYTOCHROME C.

Об'єкт дослідження — молекулярні механізми ураження серця при розвитку цукрового діабету та серцевої недостатності.

Мета роботи — дослідити вплив омега 3 ПНЖК та кверцетину на рівень експресії генів, що регулюють патологічні процеси у міокарді експериментальних тварин на моделях розвитку серцевої недостатності та цукрового діабету.

Методи дослідження — молекулярно-біологічні методи визначення рівня експресії генів та проапоптотичного білка цитохрому C у міокарді тварин.

Висновки.

Було досліджено експресію генів, що регулюють патологічні процеси, у міокарді тварин із серцевою недостатністю та цукровим діабетом та показано модулюючий вплив омега-3 ПНЖК та кверцетину на їхній рівень. Виявлено молекулярні мішені впливу досліджуваних сполук при розвитку серцевої недостатності різного генезу.

1. У контрольних зразках, а також у міокардах тварин із STZ-діабетом та при дії омега 3 ПНЖК та кверцетину ознак індукції мітохондріального сигнального шляху апоптозу виявлено не було.
2. Розвиток STZ-діабету призводить до різкого зростання рівня експресії гена *Cyp2e1*, деякого збільшення рівня *ILR*, та тенденції до зростання рівнів експресії генів *MYC*, *IL6* та *Col 1*.
3. Введення щурам із STZ-діабетом препарату ПНЖК із збагаченим вмістом омега-3 ПНЖК призводить до істотного зниження *IL6*, падіння рівня *ILR* та *Col 1* та деякого недостовірного зростання гена *MYC*. Особливої уваги заслуговує те, що рівень експресії гена *Cyp2e1*

- залишається на дуже високому рівні, не змінюючись відносно діабетичних показників.
4. Введення тваринам із STZ-діабетом кверцетину спричиняє зниження рівня експресії генів *IL6* та *Col 1*, залишає незмінним рівень *ILR*. Кверцетин викликає деяке зростання рівня *MYC*, але такі зміни не є достовірними. Рівень експресії гена *Cyp2e1*, як і у випадку дії ПНЖК, залишається на дуже високому рівні, не змінюючись відносно діабетичних показників.
 5. При розвитку серцевої недостатності у гіпертензивних тварин (лінія SHR) старечого віку спостерігалось різке зростання рівнів *Cyp2e1* та *Col 1*, тенденція до зростання рівнів генів *MYC* та *ILR* порівняно із молодими SHR. Варто зазначити, що відбувається значна активація гена *MYC* у міокарді молодих SHR порівняно із нормотензивними молодими тваринами (лінія Wistar).
 6. Введення гіпертензивним тваринам старечого віку омега-3 ПНЖК призводить до різкого падіння експресії *MYC* та *Cyp2e1*, помірному зниженню *Col 1* та майже не змінює рівень *ILR*.
 7. Введення гіпертензивним тваринам старечого віку кверцетину істотно знижує рівень експресії всіх досліджуваних генів. Це може вказувати на високий потенціал використовувати цей біофлавоноїд не лише як біодобавку, але і як лікі саме при розвитку серцевої недостатності, спричиненої хронічною тривалою гіпертензією.

Report: 46 pages, 1 table, 6 figures, 44 sources.

DIABETES MELLITUS, HEART FAILURE, MYOCARDIUM, CYP2E1, MYC, ILR, IL6, Col 1, CYTOCHROME C.

The object of research is the molecular mechanisms of heart damage in the development of diabetes and heart failure.

The aim of the study was to investigate the effect of omega 3 PUFAs and quercetin on the level of expression of genes that regulate pathological processes in the myocardium of experimental animals in models of heart failure and diabetes.

Research methods - molecular biological methods for determining the level of expression of genes and proapoptotic protein of cytochrome C in the myocardium of animals.

Conclusions.

The expression of genes that regulate pathological processes in the myocardium of animals with heart failure and diabetes was studied and the modulating effect of omega-3 PUFA and quercetin on their level was shown. Molecular targets of the influence of the studied compounds in the development of heart failure of different pathogenesis have been identified.

1. In control samples, as well as in the myocardium of animals with STZ-diabetes and omega 3 PUFA and quercetin, no signs of induction of mitochondrial signaling apoptosis were detected.

2. The development of STZ-diabetes leads to a sharp increase in the level of expression of the Cyp2e1 gene, some increase in the level of ILR, and a tendency to increase the expression levels of the genes MYC, IL6 and Col 1.

3. Administration of omega-3 -enriched PUFAs to rats with STZ diabetes leads to a significant decrease in IL6, a decrease in ILR and Col 1 and some insignificant growth of the MYC gene. Of particular note is that the expression level of the Cyp2e1 gene remains very high, unchanged relative to diabetic parameters.

4. Administration of quercetin to animals with STZ-diabetes reduces the expression of IL6 and Col 1 genes, leaving the ILR level unchanged. Quercetin causes some increase in MYC levels, but such changes are not significant. The level

of expression of the Cyp2e1 gene, as in the case of PUFAs, remains at a very high level, without changing relative to diabetic indicators.

5. With the development of heart failure in hypertensive animals (SHR line) in the elderly, there was a sharp increase in the levels of Cyp2e1 and Col 1, a tendency to increase the levels of MYC and ILR genes compared to young SHR. It should be noted that there is a significant activation of the MYC gene in the myocardium of young SHR compared with normotensive young animals (Wistar line).

6. Administration of omega-3 PUFAs to old hypertensive animals leads to a sharp decrease in the expression of MYC and Cyp2e1, a moderate decrease in Col 1 and almost no change in ILR levels.

7. Administration of quercetin to old hypertensive animals significantly reduces the expression level of all studied genes. This may indicate a potentially high ability to use this bioflavonoid not only as a bioadditive but also as a drug in the development of heart failure caused by chronic hypertension.

ЗМІСТ

Перелік скорочень та умовних позначень	9
Вступ	10
1 Матеріали та методи	14
1.1 Тварини та робота з біоматеріалом	14
1.2 Введення тваринам модуляторів експресії PPAR природного походження – препарату із високим вмістом омега-3 ПНЖК та кверцетину	14
1.3 Відтворення експериментальної моделі розвитку стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету 1 типу (STZ-діабету)	15
1.4 Моделювання розвитку серцевої недостатності	15
1.5 Визначення проапоптотичних процесів у міокарді експериментальних тварин	16
1.5.1. Отримання мітохондріальної та цитозольної фракцій з міокарду тварин	16
1.5.2. Вимірювання концентрації білка у мітохондріальній та цитозольній фракціях міокарду	16
1.5.3. Приготування зразків для нанесення у поліакриламідний гель.	17
1.6 SDS–ПААГ електрофорез та Вестерн-блот аналіз вмісту таргетних білків	17
1.7 Визначення рівня експресії таргетних генів у міокарді тварин методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі	18
1.7.1. Дизайн праймерів для проведення ПЛР у реальному часі	18
1.7.2. Виділення РНК та синтез кДНК на матриці РНК з міокарду тварин	19
1.7.3. Проведення ПЛР у реальному часі	19

1.8 Статистична обробка даних	20
2 Результати	21
2.1 Дослідження проапоптотичних процесів у міокарді експериментальних щурів на моделі STZ-індукованого цукрового діабету 1 типу	21
2.2 Дослідження проапоптотичних процесів у міокарді експериментальних щурів на моделі STZ-індукованого цукрового діабету 1 типу	23
2.2.1. Дослідження рівня експресії генів <i>MYC</i> та <i>Cyp2e1</i>	23
2.2.2. Дослідження рівня експресії генів <i>ILR</i> , <i>IL6</i> та <i>Col 1</i>	25
2.3 Дослідження рівня експресії генів, що регулюють патологічні процеси у міокарді тварин із спонтанною гіпертензією (щурів лінії SHR)	27
2.3.1. Дослідження рівня експресії генів <i>MYC</i> та <i>Cyp2e1</i>	27
2.3.2. Дослідження рівня експресії генів <i>ILR</i> та <i>Col 1</i>	29
3. Обговорення	30
Висновки	39
Перелік джерел посилання	41

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню;

ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти;

ПОЛ – пероксидне окислення ліпідів;

СН – серцева недостатність;

ЦД – цукровий діабет;

Gadph – гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа;

Col 1 α 1 – ген, якій кодує білок колагену типу 1 α 1;

IL1R1 (ILR) – ген, якій кодує рецептор типу 1 до інтерлейкіну 1;

IL6 – ген, якій кодує інтерлейкін 6;

MYC - прото-онкоген, якій кодує однойменний фактор транскрипції;

PPAR – рецептори активації проліферації пероксисом або пероксисом проліфератор активуючі рецептори;

CYP2E1 – цитохром P450 2E1;

Cyp2e1 – ген цитохрому P450 2E1;

SHR – Spontaneously Hypertensive Rat – експериментальна модель розвитку спонтанної гіпертензії у щурів;

STZ – стрептозотоцин.

ВСТУП

Серцева недостатність і пов'язані з нею інвалідизація та смертність зростають тривожними темпами, значною мірою через зростання темпів старіння, поширення серед населення багатьох країн таких патологій, як ожиріння та цукровий діабет.

Артеріальна гіпертензія (АГ) є одним з основних факторів, що спричиняють розвиток хронічної серцевої недостатності (ХСН) та інфаркту міокарда. Хронічний вплив підвищеного артеріального тиску (АТ) з часом призводить до ослаблення інотропної функції серця та застійних явищ у різних відділах організму. Часто ХСН пов'язують із порушенням систолічної функції міокарда. Проте з сучасним уявленням на патофізіологію ХСН систолічна дисфункція сприймається лише як один із чинників поруч із зміною напруги стінок і структури діастолічного наповнення, тобто з тим, що входить у поняття «ремоделювання міокарду». В останні роки все частіше зустрічаються дані про велику значущість діастолічної дисфункції (ДД) у виникненні, клінічному перебігу та прогнозі ХСН [1].

Клінічні результати показують, що прогноз розвитку серцевої недостатності значно гірший для пацієнтів із цукровим діабетом, ніж у пацієнтів без цієї патології. У людей з цукровим діабетом наявність дисфункції міокарда за відсутності явної клінічної ішемічної хвороби серця, клапанного захворювання та інших звичайних факторів серцево-судинного ризику, таких як гіпертонія та дисліпідемія, призвела до появи описового терміну - діабетична кардіоміопатія. Поширеність діабетичної кардіоміопатії зростає паралельно із зростанням кількості випадків цукрового діабету. Діабетична кардіоміопатія спочатку характеризується фіброзом міокарда, дисфункціональним ремоделюванням і пов'язаною з ним діастолічною дисфункцією. Потім розвивається систолічна дисфункція і, зрештою, є наявною клінічна картина серцевої недостатності. Порушення інсулін-залежного сигналіngu у міокарді, дисфункція мітохондрій, інтенсифікація

пероксидних процесів та розвиток оксидативного стресу, зниження біодоступності оксиду азоту, підвищення кінцевих продуктів глікації та жорсткості кардіоміоцитів на основі колагену та позаклітинного матриксу, порушення мітохондріальної та кардіоміоангіотензійної системи, системи реакцій мітохондрій і кардіоміоангіон-міостерона. активація, вегетативна нейропатія серця, стрес ендоплазматичного ретикулуму, мікросудинна дисфункція та безліч серцевих метаболічних порушень – усі вони залучені до розвитку та прогресування діабетичної кардіоміопатії. Виявлено, що молекулярні механізми, пов'язані з основними патофізіологічними змінами у діабетичному міокарді, включають порушення експресії та функціонування активованої АМФ протеїнкінази, рецепторів активації проліфераторації пероксисом, O-пов'язаного N-ацетилглюкозаміну, протеїнкінази C, мікроРНК, екзосом тощо [2]. В даній роботі нашу увагу було сфокусовано на модуляції PPAR-сигналіngu, а саме змінах експресії таргетних генів та генів, асоційованих із цими процесами.

Рецептори активації проліферації пероксисом (PPAR) - PPAR α PPAR δ і PPAR γ , є факторами транскрипції, які регулюють експресію багатьох генів, після їхньої активації лігандами. PPAR α збільшує поглинання клітинами жирних кислот, їхню етерифікацію та транспортування, а також регулює гени метаболізму ліпопротеїнів. PPAR δ стимулює утилізацію ліпідів і глюкози шляхом підвищення функції мітохондрій і шляхів десатурації жирних кислот. Навпаки, PPAR γ сприяє поглинанню жирних кислот, утворенню тригліцеридів і зберіганню у ліпідних краплях, тим самим підвищуючи чутливість до інсуліну та метаболізм глюкози. PPAR також спричиняють антиатерогенну та протизапальну дію на судинну стінку та імунні клітини. PPAR є фізіологічними головними перемикачами в серці, керуючи серцевим енергетичним метаболізмом в кардіоміоцитах, таким чином впливаючи на патологічну серцеву недостатність і діабетичну кардіоміопатію [3]. Дані літератури свідчать, що PPAR відіграють вирішальну роль у серцево - судинних захворюваннях. Виявлено, що ізоформи PPAR по-різному

експресуються в передсердях та шлуночках серця з діабетом через збільшення запальних цитокінів та окисного стресу. Крім того, було показано збільшення експресії білка та мРНК PPAR- γ , але зменшення експресії білка та мРНК PPAR- α та PPAR- δ у серцях з гіпертонічною хворобою. Діабетичні щури із спонтанною гіпертензією асоціювалися з більшим зниженням серцевих PPAR- α та PPAR- δ , але більш високим збільшенням рівня мРНК PPAR- γ та білка, ніж спонтанно гіпертонічні щури. Діабетична кардіоміопатія асоціюється зі збільшенням серцевих PPAR- γ і зменшенням PPAR- α , що призводить до зміненого транспортування глюкози, підвищення накопичення ліпідів серця та прогресування діабетичної кардіоміопатії [4].

Нові агоністи PPAR в клінічній розробці відкривають нові можливості для лікування метаболічних та серцево-судинних захворювань [3].

Крім того, використання лігандів та агоністів (синтетичних та/або природнього походження) надає змогу досліджувати молекулярні механізми вище зазначених біологічних ефектів PPAR. Зокрема, широковідомими природними лігандами та активаторами PPAR γ є моно- та поліненасичені жирні кислоти (зокрема γ -LA, AA, EPA, DHA), метаболіти арахідонової кислоти 8(S)-HETE, 15-HETE, EET, 20-COOH-AA, PGE₂, 15d-PGJ₂, тощо [5]. В останні роки з'явилися поодинокі роботи, які підтверджують що кверцетин може проявляти певні кардіопротекторні властивості, подібно до дії агоністів PPAR γ [6]. Була показана важлива роль кверцетину в профілактиці серцевої недостатності, у тому числі виявлені його протизапальні, антиоксидантні, антиатеросклеротичні та антигіпертензивні властивості. Можливо, така дія обумовлюється здатністю кверцетину впливати на PPAR γ [7]. Було показано, що кверцетин здатен регулювати ліпідний обмін можливо через модуляцію PPAR α [8].

Отже дослідження молекулярних механізмів впливу омега-3 ПНЖК та кверцетину, як модуляторів експресії PPARs, на рівень експресії генів, що регулюють патологічні процеси у міокарді на моделі розвитку серцевої

недостатності та цукрового діабету, є надзвичайно актуальним для дослідження фармакологічних властивостей потенційних кардіопротекторів, а також має теоретичну значимість, оскільки отримані результати допоможуть у деталізації механізмів розвитку серцевої недостатності, зокрема молекулярних механізмів кардіопротекторних біологічних ефектів PPARs.

1 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

1.1 Тварини та робота з біоматеріалом

Тварини були розведені у віварії Інституту фізіології НАН України ім. О.О. Богомольця (Київ, Україна). Щурів утримували у клітках для тварин із вільним доступом до їжі та води за умов: 12/12-годинний цикл світло / темрява при постійній температурі (22 ± 2 ° C). Наприкінці експерименту тварин зважували і декапітували під наркозом (пентобарбітал натрію, 60 мг / кг маси тіла). Серце швидко видаляли, промивали у 0,9% NaCl, зважували, відбирали зразки тканин міокарду для фракціонування, іншу частину міокарду заморожували у рідкому азоті. Зразки тканин зберігали при -80°C для подальшого аналізу. Всі процедури виконувались відповідно до рекомендацій комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України (Київ, Україна) та Директив Європейського Союзу щодо утримання та проведення експериментів на тваринах 2010/63 / ЄС та правил роботи з лабораторними тваринами [9].

1.2 Введення тваринам модуляторів експресії PPAR природного походження – препарату із високим вмістом омега-3 ПНЖК та кверцетину

Визначеним експериментальним тваринам протягом 4 тижнів вводили *per os* суміш омега-3 ПЖНК (препарат “Епадол”, що містить не менше ніж 43% ефірів омега-3 ПЖНК тваринного походження, виробництва Київського вітамінного заводу). Добова доза препарату складала 0,1 мл на 100 г маси тіла тварини, при цьому кожна тварина отримала щодня приблизно 43 мг ефірів ЕРА и ДНА на 100 г маси тіла [10]. Інші тварини впродовж 4 тижнів щодня отримували *per os* кверцетин у дозі 5 мг на 100 г маси тіла [11].

1.3 Відтворення експериментальної моделі розвитку стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету 1 типу (STZ- діабет)

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 140-200 г, віком 3-4 міс. Тварини перед початком досліджень були випадковим чином розподілені на групи: контрольну - 6 тварин, та експериментальну (STZ-діабетичну) - 18 особин, яку потім розподіляли на три групи по 6 тварин. Як контроль використовували інтактних щурів аналогічної лінії та віку. Експериментальний цукровий діабет моделювали одноразовим введенням стрептозотоцину ("Sigma", США). Препарат розводили 0,1 М цитратним буфером (рН 4,5) і вводили тваринам внутрішньоочеревинно із розрахунку 55 мг/кг маси тіла [11]. Розвиток гіперглікемії детектували на 3 день після введення стрептозотоцину за зростанням рівня глюкози в крові, який вимірювали за допомогою стандартного набору (глюкометр і тест-смужки Accu-Chek Active, Roche, Німеччина). Подальше дослідження проводили на тваринах, у яких рівень глюкози в крові на третій день експерименту перевищував 14 ммоль/л. Таких тварин випадковим чином розподіляли на 3 групи по 6 тварин у кожній: 1. контроль розвитку цукрового діабету, 2. Тварини, яким вводили препарат із високим вмістом омега-3 поліненасичених жирних кислот «Епадол» у відповідних дозах (див. розд.1.2), 3. Тварини, яким вводили кверцетин у визначених дозах (див. розд.1.2). Через 4 тижні після індукції діабету у тварин вимірювали рівень глюкози в крові, їх зважували та декапітували.

1.4 Моделювання розвитку серцевої недостатності

Для моделювання серцевої патології, яка виникала внаслідок спонтанної гіпертензії і гіпертрофії лівого шлуночка та розвивалась із віком, використовували тварин лінії SHR (Spontaneously Hypertensive rat) [12]. Для експерименту відбирали 18 щурів-самців віком 22 місяців, у яких було

підтверджено наявність високого артеріального тиску (більш ніж 150/120 мм рт.ст.). Експериментальну групу розподіляли на три групи по 6 тварин у кожній: 1. контроль розвитку серцевої недостатності, 2. тварини, яким вводили препарат із високим вмістом омега-3 поліненасичених жирних кислот «Епадол» у відповідних дозах (див. розд.1.2), 3. тварини, яким вводили кверцетин у визначених дозах (див. розд.1.2). Наприкінці експерименту у тварин вимірювали рівень глюкози в крові, їх зважували та декапітували. Як контроль використовували молодих самців щурів лінії SHR віком 3-4 місяців (6 тварин).

1.5 Визначення проапоптотичних процесів у міокарді експериментальних тварин

1.5.1. Отримання мітохондріальної та цитозольної фракцій з міокарду тварин проводили використовуючи набір реагентів Mitochondria Isolation Kit for Tissue згідно інструкції фірми виробника (Thermo Scientific, Литва). Отриманий осад мітохондріальних білків ресуспензували у фосфатному буфері.

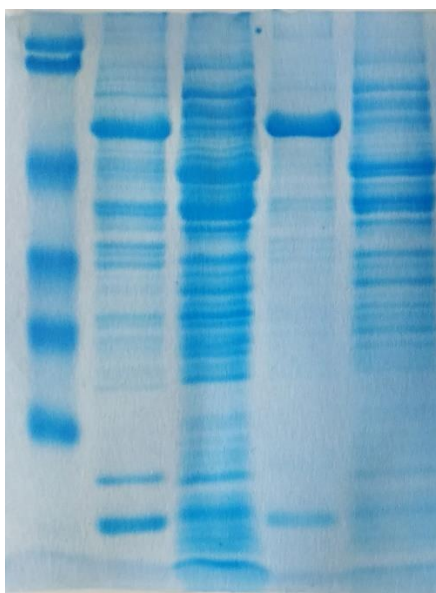
1.5.2. Вимірювання концентрації білка у мітохондріальній та цитозольній фракціях міокарду проводили за методом Лоурі [13]. Для цього зразки фракцій розводили у 100 разів до загального об'єму 0,5 мл. До 0,5 мл розведених зразків додавали 0,5 мл розчину А, який готували наступним чином безпосередньо перед експериментом: 1 об'єм розчину Тартрату (1 г Na_2CO_3 , 50 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ та 100 мг Na-виннокисло до 100 мл H_2O), 2 об'єма 5% розчину додецилсульфату натрію та 1 об'єм 0,8 н гідроксиду натрію. Інкубували у темному місті 10 хвилин. Потім додавали розчин Б, який готували: 1 об'єм розчину Фоліна та 4 об'єма H_2O . Інкубували 30 хвилин. У холостій пробі замість зразків додавали H_2O . Вимірювали поглинання розчинів при 750 нм. Вираховували концентрацію згідно попередньо

побудованого графіку залежності значення поглинання при 750 нм стандартних розчинів БСА від їхньої концентрації.

1.5.3. Приготування зразків для нанесення у поліакриламідний гель. Зразок для нанесення у поліакриламідний гель готували наступним чином: до визначеного об'єму лізату, що містить 50 мкг білка, додавали 4X буфер для зразків (Invitrogen, США) і бета-меркаптоетанол (1/10 від об'єму зразка) та кип'ятили впродовж 4 хв.

1.6 SDS–ПААГ електрофорез та Вестерн-блот аналіз вмісту таргетних білків

Проводили електрофоретичне розділення білків (по 50 мкг білку на доріжку) у 12% поліакриламідному гелі, що містить 0,1% SDS за методом [14] при наступних умовах: у 5% концентруючому поліакриламідному гелі при 15 мА, у 12% поліакриламідному розділяючому гелі при 30-40 мА (Рисунок 1.1).



M Cyt Mit Cyt Mit

Рисунок 1.1 Електрофореграма білків цитозольної та мітохондріальної фракцій міокарду щурів. М – маркер, Cyt – білки цитозолу, Mit – мітохондріальні білки.

Після електрофорезу проводили перенесення білків з поліакриламідного геля на нітроцелюлозну мембрану, використовуючи напівсухий електротрансфер при 250 mA впродовж 60 хв.

Мембрану преінкубували у молоці (5%), розведеному у PBST буфері (фосфатний буфер, що містить 0,1% Твин-20), впродовж 1 години для запобігання неспецифічної реакції з антитілами. Після того обробляли антитілами до таргетних білків (anti-Cytochrome C, anti-VDAC-1, Sigma, США) та відповідними вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою, згідно протоколів фірм виробників. Для детекції білків мембрану обробляли хемілюмінесцентними барвниками люмінолом та кумаровою кислотою, для активування реакції використовували пероксид водню. Реакцію проводили згідно ECL Western Blotting Substrate Protocol. Візуалізацію результатів проводили використовуючи ChemiDoc XRS + System with Image Lab Software (Bio-Rad, USA).

1.7 Визначення рівня експресії таргетних генів у міокарді тварин методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі

1.7.1. Дизайн праймерів для проведення ПЛР у реальному часі.

Визначення нуклеотидної послідовності специфічних праймерів для гена *Cyp2e1*, *IL6* та *Col 1* проводили використовуючи інтернет-ресурси <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> та <https://lifescience.roche.com/>. Вибір праймерів для інших таргетних генів проводили використовуючи дані літератури, таким чином обрано послідовності праймерів для генів *Gapdh* [15], *Myc* [16], *IL1R1* [17]. Послідовність праймерів наведено у таблиці 1.1.

Таблиця 1.1 Послідовність праймерів генів для проведення кількісної ПЛР

Гени	Послідовність праймерів	Довжина ПЛР продукту
<i>Gapdh</i>	Forward primer : CTACCCACGGCAAGTTCAAC Reverse primer : CCAGTAGACTCCACGACATAC	148 bp
<i>Cyp2e1</i>	Forward primer : TGAAAAAGCCAAGGAACACC Reverse primer : TGTGCTGGTGGTCTCAGTTC	178 bp
<i>IL 6</i>	Forward primer : TAGTCCTTCCTACCCCAACTTCC Reverse primer : TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC	72 bp
<i>IL1R1</i>	Forward primer : GTTTTTGGAACACCCTTCAGCC Reverse primer : ACGAAGCAGATGAACGGATAGC	105 bp
<i>Myc</i>	Forward primer : CAACGTCTTGGAACGTCAGA Reverse primer : CTCGCCGTTTCCTCAGTAAG	197 bp
<i>Col 1a1</i>	Forward primer : CAACCTCAAGAAGTCCCTGC Reverse primer : AGGTGAATCGACTGTTGCCT	77 bp

1.7.2. Виділення РНК та синтез кДНК на матриці РНК з міокарду тварин. Виділення тотальної РНК з тканин тварин та синтез кДНК проводили використовуючи набори реагентів GeneJET RNA purification kit та Maxima H Minus cDNA synthesis master mix (ThermoSci, Литва), відповідно.

1.7.3. Проведення ПЛР у реальному часі. Кількісну ПЛР проводили застосовуючи 5x Hot FirePol EvaGreen qPCR Supermix (Solis Biodynes, Естонія) згідно з протоколом фірми виробника (95 С 12 хв – активування полімерази, 95 С 15 сек. – денатурація, 60 С 30 сек. – віджиг праймерів та елонгація, 40 циклів). Реакцію проводили на обладнанні iCycler with MyIQ Single Color Real-Time PCR Detection System IQ5 software (Bio-Rad, USA). Для

підрахунку результатів використовували формулу $2^{\Delta Cq}$. Для нормалізації використовували показники, отримані для гена *Gapdh*. Результати представлені у відносних одиницях.

1.8 Статистична обробка даних

Для статистичної обробки результатів дослідження застосовували пакет програм STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc. 2004, США). Для оцінки відмінності між показниками, отриманими у досліджуваних групах, використовували t-критерій Стьюдента. Значення $P \leq 0,05$ розглядали як критерій достовірної різниці. Результати представлено у вигляді середніх значень для $n = 6$ із зазначенням середніх квадратичних відхилень.

2. РЕЗУЛЬТАТИ

2.1 Дослідження проапоптотичних процесів у міокарді експериментальних щурів на моделі STZ-індукованого цукрового діабету 1 типу

Апоптоз, або запрограмована загибель клітин, бере участь у розвитку, елімінації пошкоджених клітин і підтримці клітинного гомеостазу. Апоптоз контролюється під родиною цистеїнових протеаз, відомих як каспази. У клітинах ссавців основним шляхом активації каспаз є шлях, ініційований цитохромом С. На цьому шляху різноманітні апоптотичні стимули викликають вивільнення цитохрому С з мітохондрій, що, у свою чергу, викликає серію біохімічних реакцій, які призводять до активації каспаз та подальшої загибелі клітини [18]. Отже визначення проапоптотичних процесів у міокарді експериментальних тварин проводили досліджуючи методом Вестерн-Блот аналізу вміст цитохрому С у мітохондріальній та цитозольній фракціях міокарду тварин. Чистоту отриманої цитозольної фракції контролювали за вмістом мітохондріального білка вольтаж-залежний аніонний каналу 1 (VDAC-1), який є одним із ключових білків, які регулюють функцію мітохондрій. Цей білок є одним з найбільш експресованих на зовнішній мембрані мітохондрій. VDAC-1 регулює проходження крізь мембрани метаболітів, нуклеотидів та іонів; він відіграє вирішальну роль у регуляції апоптозу завдяки його взаємодії з апоптотичними та антиапоптотичними білками [19]. Отже VDAC-1 у переважній кількості міститься у мітохондріальній фракції, та у незначній кількості – у цитозолі.

В ході роботи нами було проаналізовано зразки мітохондріальних та цитозольних білкових фракцій з міокарду тварин різних експериментальних груп (по 5 тварин у кожній групі). У всіх зразках мітохондріальних фракцій всіх експериментальних груп та контролі було показано високий вміст проапоптотозного білка цитохрому С. Одночасно з цим в жодному

проаналізованому зразку цитозольної фракції цього білка виявлено не було (Рисунок 2.1).

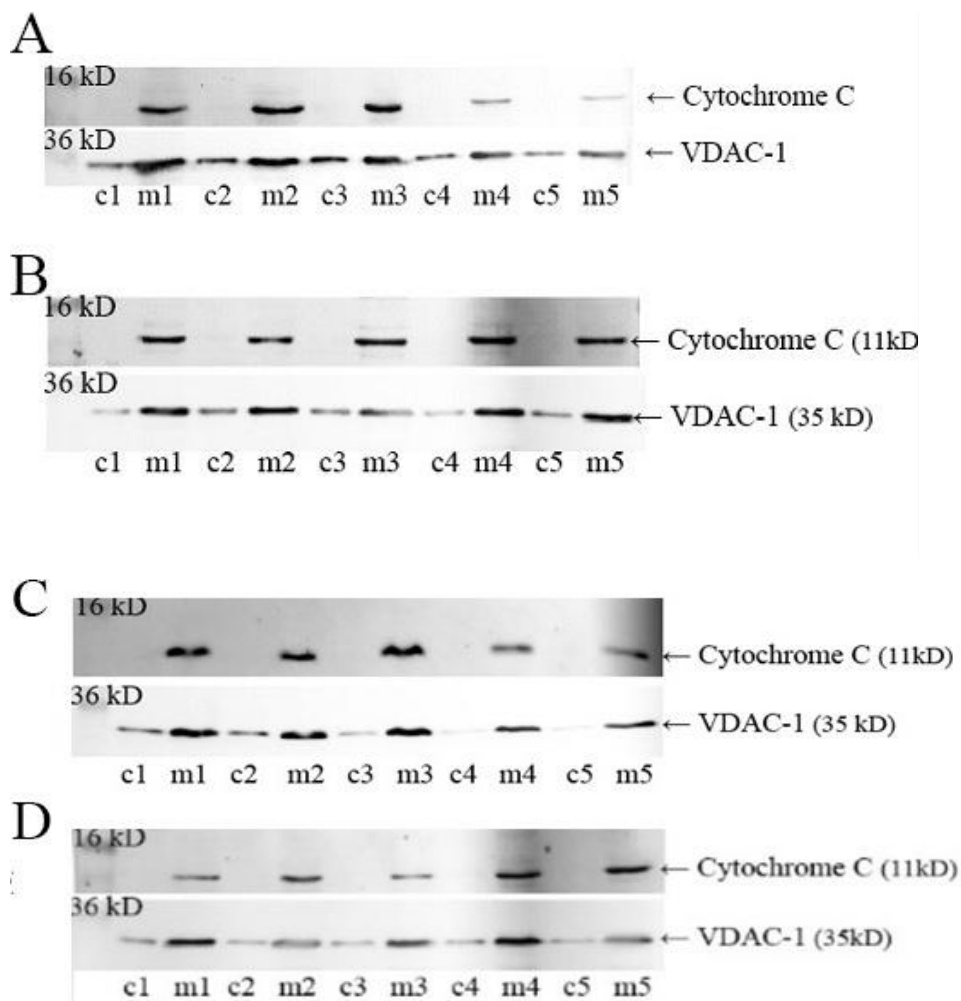


Рисунок 2.1 Вестерн-Блот аналіз зразків мітохондріальної та цитозольної фракцій міокарду експериментальних щурів. А – зразки, отримані з контрольних тварин; В – зразки, отримані з тварин із діабетом, С – зразки, отримані з діабетичних тварин при дії омега 3 ПНЖК; D - зразки, отримані з діабетичних тварин при дії кверцетину. с – цитозоль, m – мітохондріальна фракція.

Як було вже зазначено, сам вихід цитохрому С з мітохондрій до цитоплазми ініціює цілий каскад реакцій, що призводить клітину до апоптозу.

Отже ознак індукції мітохондріального сигнального шляху апоптозу у контролі, а також у міокардах тварин із діабетом та при додаванні у їхній раціон омега 3 ПНЖК та кверцетину виявлено не було.

2.2 Дослідження рівня експресії генів, що регулюють патологічні процеси у міокарді тварин із STZ-індукованим діабетом

2.2.1. Дослідження рівня експресії генів *MYC* та *Cyp2e1*. Відомо, що при розвитку діабетичної кардіоміопатії основними патогенетичними процесами є оксидативний стрес та як наслідок внутріструктурні ушкодження кардіоміоцитів, особливо їхніх мітохондрій. Відомо, що одним з основних чинників оксидативного стресу є підвищення експресії прооксидантного білку цитохрому P450 2E1 [20]. Показано, що при цьому кардіоміоцити зазнають значних структурно-функціональних змін, обумовлених пристосуванням міокарду до стресових умов. Основним чинником таких адаптивних реакцій є активація транскрипційного фактора *MYC*, відомого про-онкогена. Було раніше показано, що активація цього фактора призводить до розвитку гіпертрофії та адаптивних змін метаболічних та енергетичних процесів у міокарді у стресових умовах, зокрема зниження окислення жирних кислот та посилення метаболізму вуглеводнів для генерування енергії, що є адаптативним механізмом, оскільки завдяки цьому міокард не втрачає свою функціональність при стресі та або при перенавантаженні [21].

Отже нами було досліджено зміни експресії генів *MYC* та *Cyp2e1* у міокарді експериментальних тварин. Варто зазначити, що у міокарді контрольних тварин експресія гена *Cyp2e1* відбувається на низькому рівні порівняно із іншими генами. В ході роботи у міокарді діабетичних тварин було виявлено різке зростання (близько у 10 разів) рівня експресії *Cyp2e1* відносно контролю (Рисунок 2.2).

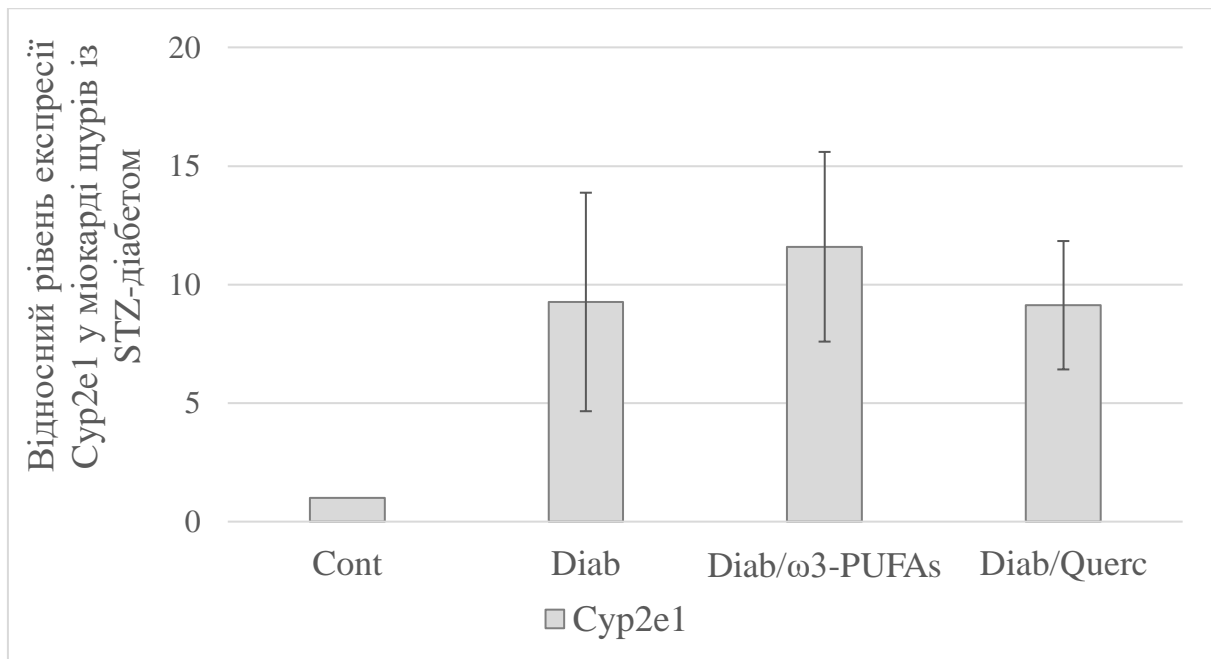


Рисунок 2.2 Зміни рівня експресії гена *Cyp2e1* у міокарді тварин із STZ-діабетом та при дії омега-3 ПНЖК та кверцетину.* достовірна різниця відносно контролю, $p \leq 0,05$, $n=5$

Експресія гена *Cyp2e1* у міокарді діабетичних тварин, яким вводили препарат омега-3 ПНЖК та кверцетин, не зазнавала достовірних змін відносно діабетичної групи та залишалась різко збільшеною порівняно з контролем (Рисунок 2.2).

В ході нашої роботи було виявлено деяке підвищення рівня експресії гена *MYC* у діабетичних тварин порівняно із контролем, але такі зміни не були достовірними (Рисунок 2.3). Також не відмічалось істотних змін у експресії гена при дії омега-3 ПНЖК та кверцетину відносно показників діабетичної групи, хоча спостерігалась деяка тенденція до зростання. Але при цьому відзначалось достовірне збільшення рівня експресії *MYC* порівняно із контролем (Рисунок 2.3). Варто зауважити, що ці результати підтверджують наші дані щодо отриманих значень співвідношення маси серця до маси тіла тварин, а саме не було виявлено достовірних ознак гіпертрофії серця у

діабетичних тварин відносно контролю, але спостерігалось дещо збільшення значень відношення маси серця як при дії препарату ПНЖК так і кверцетину (дані наведено у заключному звіті А. Шиш за 2021 р.).

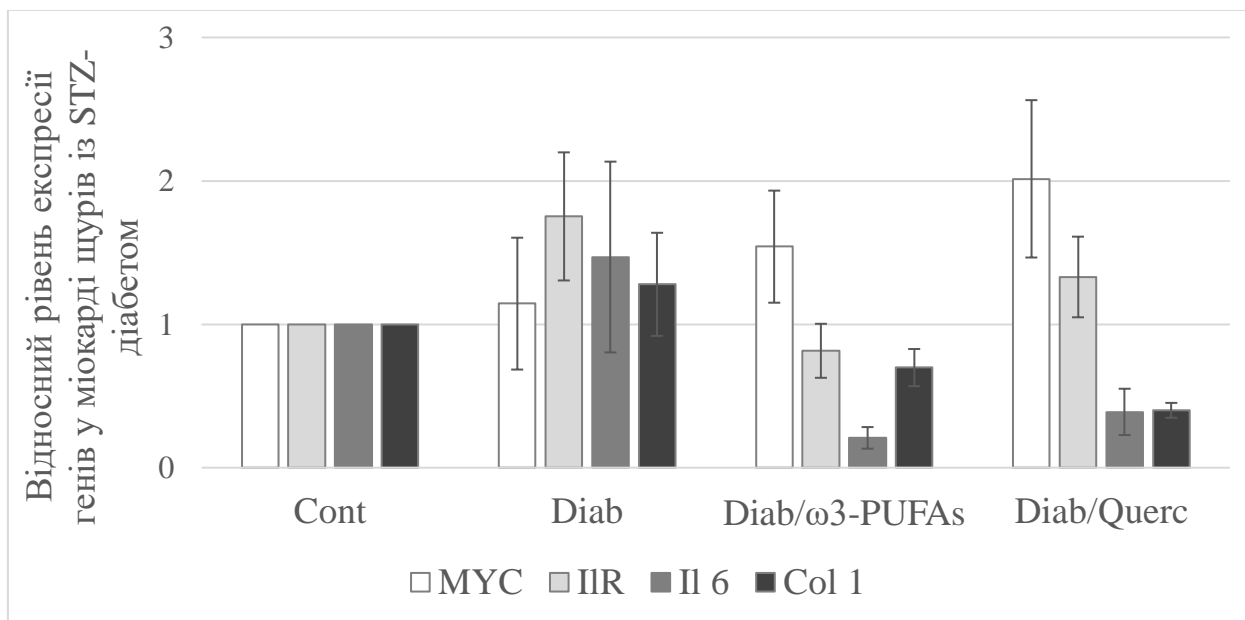


Рисунок 2.3 Зміни рівня експресії генів, що регулюють патологічні процеси, у міокарді щурів із STZ-діабетом та при дії омега-3 ПНЖК та кверцетину.

- достовірна різниця відносно контролю, * достовірна різниця відносно діабетичної групи, $p \leq 0,05$, $n=5$

2.2.2. Дослідження рівня експресії генів *ILR*, *IL6* та *Col 1*. Відомо, що серцева дисфункція пов'язана із неінфекційним запаленням серця при експериментальній діабетичній кардіоміопатії. У тварин із цукровим діабетом функція лівого шлуночка була значно порушена, що супроводжувалося значним збільшенням цитокінів, молекул клітинної адгезії, лейкоцитів і макрофагів та зростанням вмісту колагену [22].

Нами було показано деяке зростання рівнів всіх досліджуваних генів у міокарді тварин із діабетом відносно контролю (Рисунок 2.3), але достовірна різниця значень спостерігалась лише для гена *ILR*. Введення діабетичним

тваринам препарату омега-3 ПНЖК призводило до інгибування експресії всіх трьох генів, так рівень експресії гена *ILR* знижувався у 2 рази, гена *IL6* – у більш ніж 4 рази порівняно із показниками діабетичної групи. Рівень експресії гена *Col 1* зазнавал найменших змін, але спостерігалась чітка тенденція до зниження відносно діабетичної групи (Рисунок 2.3).

Найбільш істотні зміни експресії гена *Col 1* відмічались при дії кверцетину, при цьому його рівень падав у 3 рази відносно діабетичних показників. Рівень експресії *IL6* також різко знижувався (більше ніж у 3 рази), але от рівень *ILR* майже не змінювався, залишаючись близьким до діабетичних показників (Рисунок 2.3).

Отже розвиток діабету в умовах нашого експерименту призводить до різкого зростання рівня експресії гена *Сур2e1*, деякого збільшення рівня *ILR*, та тенденції до зростання рівнів експресії генів *MYC*, *IL6* та *Col 1*.

Введення діабетичним щурам препарату ПНЖК із збагаченим вмістом омега-3 ПНЖК призводить до істотного зниження *IL6*, падіння рівня *ILR* та *Col 1* та деякого недостовірного зростання гена *MYC*. Особливої уваги заслуговує те, що рівень експресії гена *Сур2e1* залишається на дуже високому рівні, не змінюючись відносно діабетичних показників.

Введення тваринам кверцетину спричиняє зниження рівня експресії генів *IL6* та *Col 1*, залишає незмінним рівень *ILR*. Кверцетин викликає деяке зростання рівня *MYC*, але такі зміни не є достовірними. Рівень експресії гена *Сур2e1*, як і у випадку дії ПНЖК, залишається на дуже високому рівні, не змінюючись відносно діабетичних показників.

2.3 Дослідження рівня експресії генів, що регулюють патологічні процеси у міокарді тварин із спонтанною гіпертензією (щурів лінії SHR)

2.3.1. Дослідження рівня експресії генів *MYC* та *Cyp2e1*. За отриманими у нашому експерименті даними, незначна гіпертрофія міокарда спостерігається у групі гіпертензивних тварин (SHR) молодого віку відносно нормотензивних щурів (Wistar) аналогічного віку. Більш виражена гіпертрофія виявлена у SHR старих тварин, показники цієї групи були істотно більші ніж в групах молодих та навіть старих нормотензивних тварин, а також дещо збільшені відносно гіпертензивних тварин молодого віку. Отже нами було досліджено рівень експресії гена *MYC*, як основного фактору, що спричиняє розвиток гіпертрофії серця [23]. Було виявлено значне (близько 10 раз) зростання рівня експресії гена у міокарді гіпертензивних тварин молодого віку порівняно із показниками нормотензивних тварин (Рисунок 2.4).

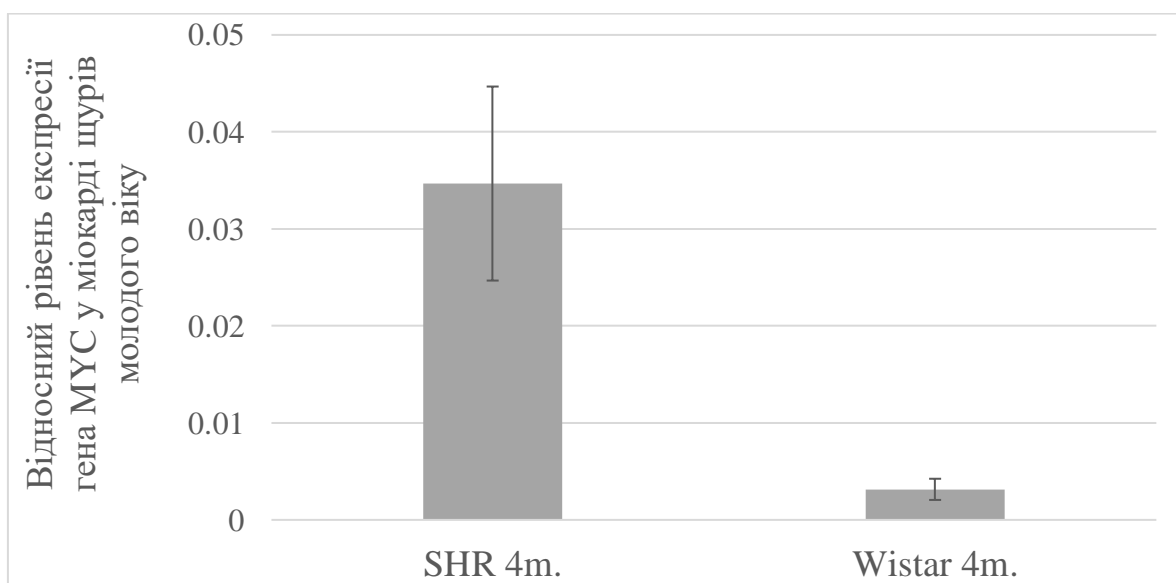


Рисунок 2.4 Зміни рівня експресії гена *MYC* у міокарді молодих тварин із спонтанною гіпертензією. * Достовірна різниця відносно контролю, $p \leq 0,05$,

n=5

Подальший розвиток патології впродовж всього життя тварини (22 місяці) спричиняв ще деяке зростання рівня експресії MYC (Рисунок 2.5). Отже впродовж довготривалого часу гіпертензія сприяла тому, що рівень MYC експресувався на дуже високому рівні, що призводило до розвитку гіпертрофії серця та могло спричиняти значні метаболічні зміни у кардіоміоцитах, зокрема зміни процесів енергетичного обміну, а саме пригнічення метаболізму жирних кислот та посиленню метаболізму глюкози [23]. Отже активація транскрипційного фактору MYC могла призводити до модуляції експресії відповідних генів, зокрема до зростання рівня експресії гена Cyp2e1, який виконує провідну роль у регуляції енергетичного обміну у мітохондріях [24].

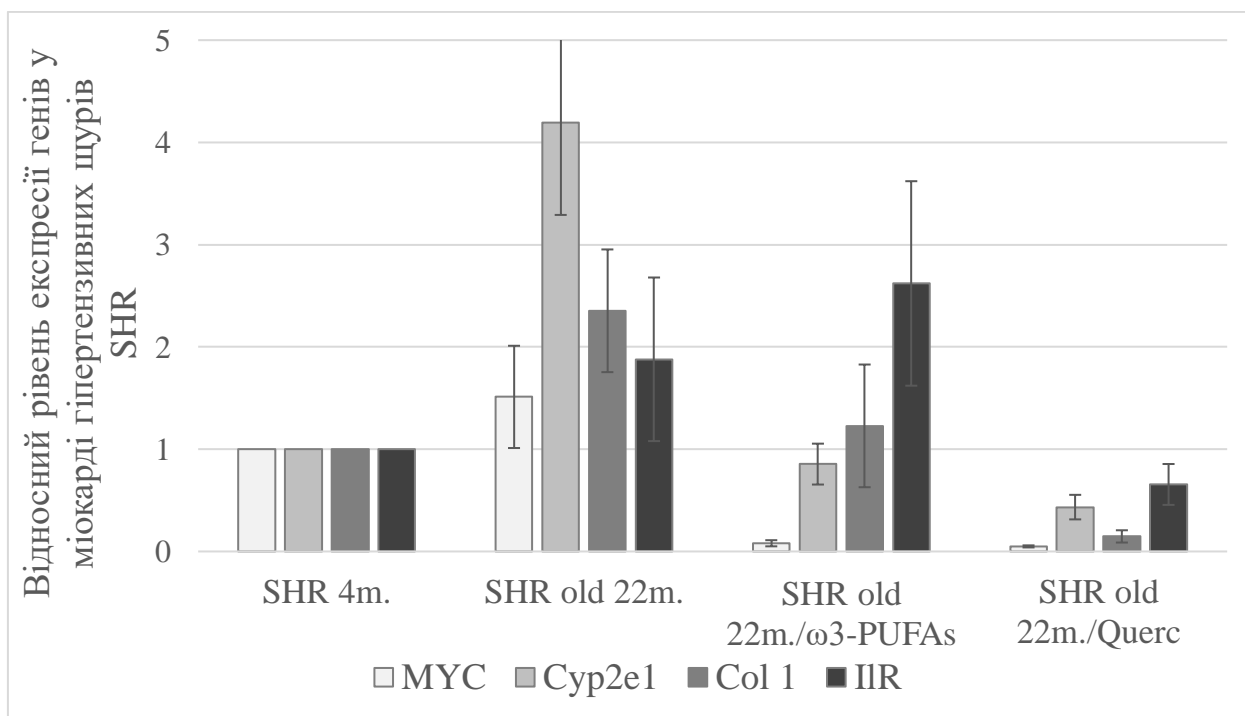


Рисунок 2.5 Зміни рівня експресії генів, що регулюють патологічні процеси, у міокарді щурів із спонтанною гіпертензією (SHR) та при дії омега-3 ПНЖК та кверцетину.

- Достовірна різниця відносно молодих гіпертензивних щурів (SHR 4m),*
достовірна різниця відносно старих гіпертензивних щурів (SHR 22m) ,
 $p \leq 0,05$, $n=5$

Нами було виявлено значну активацію експресії цього гена (більш ніж у 4 рази) у міокарді гіпертензивних тварин старечого віку (22 місяці) порівняно із молодими гіпертензивними тваринами (4 місяці) (Рисунок 2.5).

2.3.2. Дослідження рівня експресії генів *ILR* та *Col 1*. У групі старих гіпертензивних щурів було виявлено також зростання (близько у 2 рази) рівня експресії генів *ILR* та *Col 1* порівняно із показниками молодих SHR (Рисунок 2.5).

При введенні старим тваринам препарату омега-3 ПНЖК відзначалось різке зниження рівнів генів *MYC* (у 20 разів), *Cyp2e1* (у 5 разів) та більш помірне - гена *Col 1* (у 2 рази) відносно показників старих SHR. При цьому експресія *ILR* дещо зросла, але не досягла достовірних значень. Довготривала дія кверцетину призвела до більш значимого падіння рівня всіх досліджуваних генів: рівень експресії гена *MYC* (у 30 разів), *Cyp2e1* (у 10 разів), *Col 1* (у 16 разів) та *ILR* (у 3 рази) (Рисунок 2.5).

Отже було виявлено наступні зміни: при розвитку патології у старих SHR спостерігалось різке зростання рівнів *Cyp2e1* та *Col 1*, тенденція до зростання рівнів генів *MYC* та *ILR* порівняно із молодими SHR. Варто зазначити, що відбувається значна активація гена *MYC* у міокарді молодих SHR порівняно із нормотензивними молодими Wistar.

Введення тваринам омега-3 ПНЖК призводить до падіння експресії *MYC*, *Cyp2e1*, *Col 1* та майже не змінює рівень *ILR*.

Введення тваринам кверцетину істотно знижує рівень експресії всіх досліджуваних генів.

3. ОБГОВОРЕННЯ

Незважаючи на сучасну оптимальну терапію, смертність пацієнтів з ішемічною хворобою серця та серцевою недостатністю залишається високою, особливо у випадках із цукровим діабетом як супутнім захворюванням [25]. Серцева недостатність є дуже хворобливим і смертельно небезпечним клінічним станом, який є останньою стадією більшості серцево-судинних захворювань. Діабет тісно пов'язаний із збільшенням частоти серцевої недостатності та безпосередньо сприяє розвитку гіпертрофії серця, запальних процесів, фіброзу та апоптозу [26]. Отже в ході роботи нами було досліджено зміни експресії генів, що регулюють вищевказані процеси, у міокарді тварин із діабетом та спонтанною гіпертензією, та вивчено вплив на ці процеси модуляторів PPAR – омега-3 ПНЖК та кверцетину.

Відомо, що у серці дорослої людини регуляція експресії генів окислення жирних кислот (енергетичний обмін) контролюється фактором транскрипції PPAR γ -1, що належить до родини ядерних рецепторів PPAR. Однак у відповідь на патологічні стресові фактори, такі як гемодинамічне навантаження або ішемія, у серцевих міоцитах значно знижується активність PPAR, що призводить до падіння рівня експресії генів окислення жирних кислот. У нормі окислення мітохондріальних жирних кислот є основним джерелом виробництва енергії в міокарді, але при серцевій недостатності рівень такого окислення часто знижується, при цьому гліколітичні шляхи стають більш переважаючими, що в кінцевому підсумку спричиняє скорочувальну дисфункцію [27-29]. Виявлено, що хронічна гіпертензія також призводить до зменшення рівня окислення жирних кислот та пригнічує патологічне ремоделювання. При цьому зниження експресії PPAR, специфічного для кардіоміоцитів, може спричинити розвиток серцевої гіпертрофії. Разом з цим було показано, що і надмірна експресія PPAR γ також може призводити до гіпертрофії [29]. Цікаво, що на початкових етапах розвитку серцевої недостатності навіть при зниженні експресії PPAR

зберігається скоротлива функція міокарду за рахунок, ймовірно, активації інших факторів транскрипції, зокрема Мус. Було показано, що активація Мус в міокарді дорослих мишей призводить до гіпертрофії міокарду, збільшує поглинання та використання ним глюкози, знижує процеси окислення жирних кислот шляхом зниження рівня PPAR та індукує біогенез мітохондрій у кардіоміоцитах. При цьому інактивація Мус у дорослому міокарді послаблювала гіпертрофічний ріст і зменшувала експресію генів гліколітичного та мітохондріального біогенезу у відповідь на гемодинамічне навантаження. Показано також, що метаболічні зміни, опосередковані Мус, були пов'язані із збереженням серцевої функції та покращенням відновлювальних процесів після ішемії. Отже можна припустити, що Мус безпосередньо регулює метаболізм глюкози та біогенез мітохондрій у серцевих міоцитах і є важливим регулятором енергетичного обміну в серці, сприяє розвитку гіпертрофії міокарду у відповідь на патологічні стани та стрес [28].

Іншими авторами показано, що в серці дорослої людини за нормальних фізіологічних умов ген Мус експресується на низькому рівні. Але у відповідь на гіпертрофічні подразники експресія Мус різко зростає [30]. Подібні дані щодо різкої активації експресії гена Мус були отримані нами при дослідженні змін рівня мРНК цього гена у міокарді гіпертензивних тварин порівняно із показниками нормотензивних щурів аналогічного молодого віку. Слід зазначити, що із віком така активація і далі продовжувала зростати у гіпертензивних щурів. Отримані дані повністю підтверджувались даними щодо розвитку гіпертрофії міокарду у гіпертензивних щурів порівняно із нормотензивними тваринами. Було показано, що така активація Мус в міокарді дорослих мишей збільшує поглинання та використання глюкози, зменшує окислення жирних кислот шляхом зниження рівня PPAR α та індукує мітохондріальний біогенез. При цьому незважаючи на збільшення маси серця, функція лівого шлуночка залишалася нормальною [21].

На відміну від моделі SHR, ознак гіпертрофії міокарду у тварин із індукованим діабетом в умовах нашого експерименту виявлено не було. Не було також виявлено достовірного зростання рівня експресії гена *Myc* у міокарді діабетичних щурів порівняно з контролем. Хоча спостерігалась деяка тенденція до збільшення цього показника.

У свою чергу підвищення експресії *Myc* у міокарді є ключовим фактором для індукції транскрипції багатьох генів, серед яких *Cyp2e1* (ген цитохрому P450 2E1), особливо при стресі або гострому ушкодженні (ішемії або інфаркті).

Нами було показано значне зростання рівня експресії гена *Cyp2e1* (у 4 рази) у міокарді гіпертензивних тварин старечого віку порівняно із молодими SHR, що асоціюється із розвитком патології. Як було показано іншими авторами рівень експресії гена *Myc* у міокарді тварин із спонтанною гіпертензією (SHR) був значно підвищеним та асоціювався із гіпертрофією серця та атеросклерозом [23]. Отже, при хронічній гіпертензії підвищена експресія *Myc* може бути провідним фактором індукції експресії *CYP2E1* [31].

CYP2E1, ймовірно, є маркером дії різних патофізіологічних чинників і станів в міокарді, а підвищена експресія *CYP2E1* відіграє декілька патофізіологічних ролей в серце, від індукції оксидативного стресу та апоптозу, до залучення у шляхи утворення та постачання енергії для задоволення підвищених потреб серця в енергії при патологічних станах. Отже підвищення рівня експресії *CYP2E1* на початкових стадіях розвитку серцевої недостатності може бути адаптацією міокарду до умов зміни шляхів енергетичного обміну, що забезпечує схоронність скоротливої функції серця. З іншого боку, оксидативний стрес, що може бути спричинений підвищеним *CYP2E1*, є одним з визначальних патологічних механізмів розвитку серцевих захворювань [32].

Більш значуще зростання рівня експресії гена *Cyp2e1* нами було показано у міокарді тварин із цукровим діабетом (у 10 разів) порівняно із

контролем. Існує думка, що Cyp2e1 належить до генів, які найбільш активуються при цукровому діабет [32, 33].

Така активація гена може бути пов'язана з відсутністю інгібуючого впливу гормону інсуліну на рівень транскрипції відповідного гена, що має місце при значному зниженні інсуліну в крові або інсулінорезистентності [34]. До збільшення експресії цитохрому могла призвести активація Muc, яка відбувається у відповідь на оксидативний стрес у міокарді при розвитку STZ-діабету у щурів [31]. Як було зазначено вище, активація Muc значно індукує експресію CYP2E1, що у свою чергу призводить до ще більшої інтенсифікації генерації радикалів кисню та посилення оксидативного ураження міокарду, що у кінцевому результаті спричиняє розвиток діабетичної кардіоміопатії [31]. Зокрема підвищений вміст цитохрому P450 2E1 може вносити вклад у патогенетичні зміни кардіоміоцитів, включаючи оксидативне ушкодження мітохондрій, інгибування аутофагії та мітофагії, можливо через активацію передачі сигналів iNOS, що спричиняє розвиток скоротливої дисфункції [34]. З іншого боку зростання рівня CYP2E1 може мати адаптивне значення. Так, беручи участь у метаболізмі ендогених кетонів, а також у глюконеогенезі, а саме у метаболізмі кетонових тіл, які можуть бути ефективним джерелом енергії при певних патологічних станах, цитохром P450 2E1 вносить вагомий вклад у забезпечені енергією міокард у станах перенавантаження та стресу [32].

В нашій роботі із використанням моделей розвитку серцевої недостатності, включаючи модель спонтанної гіпертензії та індукції серцевої недостатності при STZ-індукованому діабеті, так само як і в дослідженнях інших авторів, із використанням трансгенних тварин та технології нокаутування деяких генів, а також у пацієнтів із кардіоміопатією, було виявлено значне збільшення рівня CYP2E1 в тканинах серця. Це дозволяє припустити, що активація CYP2E1 в міокарді є звичайним явищем при різноманітних серцевих захворюваннях і станах [32], і може бути маркером

розвитку серцевої патології при гіпертонії, цукровому діабеті, кардіоміопатії, ішемії та інфаркті міокарда.

У свою чергу оксидативний стрес та надлишок радикальних сполук можуть ініціювати запальні процеси та апоптоз. Для виявлення апоптотичних процесів ми проводили вивчення можливих змін у внутрішньоклітинній локалізації проапоптотичного білку цитохрому С. Згідно наших раніше отриманих даних при мікроскопічному дослідженні ультраструктури кардіоміоцитів виявлено ознаки пошкодження мітохондрій, що могло сприяти вивільненню цитохрому С з мітохондрій у цитоплазму та спричинити ініціацію апоптозу. Але згідно отриманих нами даних появи досліджуваного білку у цитозольній фракції як контрольних так і діабетичних тварин виявлено не було. Отже в умовах нашого експерименту не було виявлено ознак індукції мітохондріального шляху апоптозу.

Відомо, що запальні процеси у міокарді вносять вагомий вклад у розвиток діабетичної кардіоміопатії. Показано, що кілька молекулярних механізмів пов'язують діабет із запаленням міокарда. Сигнальний шлях NF- κ B і система ренін-ангіотензин-альдостерон сильно активуються в діабетичному серці, тим самим сприяючи запалення міокарда. Кінцеві продукти метаболізму глюкози також є сильними тригерами запалення. Медіатори, що виникають у результаті цього запального процесу, модулюють специфічні внутрішньоклітинні сигнальні механізми в клітинах серця, що сприяє розвитку діабетичної кардіоміопатії. [26]. Нами було виявлено підвищення рівня експресії гена рецептора інтерлейкіну 1 (IL1RI) у міокарді діабетичних та гіпертензивних тварин порівняно із відповідним контролем. Тенденція до зростання також спостерігалась і у випадку гена інтерлейкіну 6 (IL6) у діабетичних тварин. Іншими авторами показана значна індукція вказаних генів при більш вираженому ураженні серця, а саме інфаркті міокарду, для якого характерні виражені запальні процеси, що призводять до активації фіброгених процесів [35, 36]. Одночасно з цим передача IL-1-сигналіngu зокрема через зростання експресії IL1RI відіграє важливу роль у патогенезі серцевої

недостатності, подавляючи скоротливу функцію серця, сприяючи гіпертрофії міокарду та індукуючи фіброз [37]. Дійсно нами було виявлено значну індукцію експресії гена Col 1, кодуючого білок колагену підтипу 1, та тенденцію до зростання рівня експресії цього гена у міокарді гіпертензивних щурів та тварин із діабетом, відповідно. Раніше було показано, що саме підтипи колагену I (Col I) і III (Col III) є важливими компонентами позаклітинного матриксу серця, які підтримують функціональну цілісність серця. Проте гістологічне, імуногістологічне та біохімічне дослідження демонструють характерні зміни позаклітинного матриксу серця при дилатаційній кардіоміопатії, міокардиті, ішемічній кардіоміопатії та гіпертонічній хворобі серця. Було виявлено, що механізми запалення, які спостерігаються при запальній кардіоміопатії, впливають на кількість мРНК колагену підтипів I і III [38]. До індукції прозапальних інтерлейкінів у міокарді при гіпертензії та при діабеті може призводити також модуляція PPAR, зокрема інгібування експресії PPAR α [39].

Відомо, що PPAR γ відіграє важливу роль у серцево-судинних захворюваннях, але все ще потрібно багато досліджень, щоб встановити його функцію в серцево-судинній системі. На сьогоднішній день агоністи PPAR γ широко застосовуються при цукровому діабеті та атеросклерозі, відомих факторах ризику, пов'язаних із серцево-судинними захворюваннями. Вони корисні як терапевтичні засоби, використання яких призводить до зниження резистентності до інсуліну, зниження рівня глюкози в крові, а також зменшення запалення. Однак вони також можуть мати шкідливі ефекти, такі як підвищений ризик застійної серцевої недостатності. Тому їхнє застосування обмежено в клінічних умовах. В даний час використання агоністів PPAR γ для лікування пацієнтів залишається на розсуд лікарів. Подальші дослідження з фізіології та фармакології PPAR, а також знання, отримані при використанні агоністів PPAR γ , як відомих, так і тих, що розробляються, повинні допомогти у розробці нових і безпечніших терапевтичних засобів [40]. Серед таких

можуть розглядатися сполуки природнього походження – Омега-3 ПНЖК та кверцетин.

Отже в умовах нашого експерименту довготривале введення діабетичним тваринам препарату ПНЖК із збагаченим вмістом омега-3 ПНЖК та кверцетину призвело до зниження рівня прозапальних генів та гену колагену 1 типу. Іншими авторами показано, що саме активація PPAR γ може сприяти зниженню експресії таких прозапальних факторів [40]. У свою чергу інгибування прозапальних генів призводить до нормалізації фіброгенезу у серці та до ослаблення симптомів серцевої недостатності при діабетичній кардіоміопатії, індукованої STZ [41]. Існує думка, що антицитокінова терапія здатна зняти запалення та значно полегшити прояви серцевої недостатності [22].

Нами не було виявлено достовірних змін у рівні експресії генів *Muc* та *Cyp2e1* у міокарді діабетичних тварин при дії досліджуваних агентів порівняно із діабетичним контролем. При цьому рівень експресії *Muc* залишається на контрольних позначках, дещо збільшуючись при дії кверцетину, а гена *Cyp2e1* – значно більшим від контролю. Відомо, що STZ-індукований діабет є моделлю діабету саме 1 типу, для якого характерні процеси, спричинені перш за все пригніченням або навіть повною відсутністю регулюючого впливу гормону на клітини міокарду та надлишкового рівня глюкози у крові. За даними наших колег – основного виконавця проєкту, введення діабетичним тваринам омега-3 ПНЖК та кверцетину не призводило до нормалізації вказаних показників (див. звіт Анжели Шиш за 2021 рік). Отже відсутність інгібуючого впливу інсуліну на експресію *Cyp2e1* може відігравати визначну роль. Нещодавно нами було показано, що також не зазнає змін і вміст цитохрому P450 2E1 у міокарді діабетичних тварин за дії ПНЖК та кверцетину, він залишається на рівні з діабетичними показниками і є значно вищим за контроль (див. звіт за 1 етап 2021 року). Відомо, що збільшення вмісту цитохрому P450 2E1 може сприяти інтенсифікації пероксидних процесів [32]. І саме активація PPAR γ здатна пригнічувати вироблення

активних форм кисню, які є факторами ризику серцево-судинних розладів, таких як атеросклероз, діабет, гіпертонія, ожиріння та дисліпідемія [40]. З іншого боку, як вже повідомлялось, зростання рівня CYP2E1 може мати адаптивне значення. Так, беручи участь у метаболізмі кетонових тіл, які можуть бути ефективним джерелом енергії при певних патологічних станах, цитохром P450 2E1 вносить вагомий вклад у забезпечені енергією міокард у станах перенавантаження та стресу [32].

Довготривале введення препарату омега-3 ПНЖК та кверцетину гіпертензивним тваринам значно знижувало рівень мРНК генів *Muc* та *Cyp2e1* у міокарді тварин лінії SHR старечого віку порівняно із щурами аналогічної лінії та віку, але що не споживали досліджувані агенти. Таке PPAR-залежне інгибування експресії *Muc* призводило до нормалізації показників співвідношення маси серця до маси тіла тварин (див. звіт за 2021 рік Анжели Шиш). Що й не дивно, оскільки саме ген *Muc* позитивно регулює гіпертрофічні процеси у серці [23]. У свою чергу різке зниження активності транскрипційного фактору *Muc* могло призвести до зменшення рівня мРНК гена *Cyp2e1* [31]. Зміну рівня експресії гена цитохрому також міг спричинити модулюючий вплив PPAR [42].

При дослідженні змін прозапальних маркерів у серці гіпертензивних тварин, варто зазначити, що найбільшого інгибуючого впливу зазнали гени *IL1R1* та *Col 1* саме при дії кверцетину. Відомо, що цей біофлавоноїд проявляє кардіопротективні властивості, зокрема шляхом пригнічення маркерів запалення [43], і можливо цей ефект проявляється через модуляцію у серці PPAR -сигналіngu.

Введення гіпертензивним тваринам препарату омега-3 ПНЖК не призводило до достовірних змін рівня експресії прозапального гена рецептора інтерлейкіна 1. В той же час омега-3 ПНЖК спричиняли зниження експресії гена колагену 1. Відомо, що прозапальні та фібротичні процеси тісно взаємопов'язані, пригнічення запалення призводить до інгибування фіброгенезу [41]. В умовах нашого експерименту можливо відбувається

PPAR-залежна модуляція рівня інших прозапальних генів [44], що призводило до виявленого нами зниження рівня маркера фіброгенних процесів у міокарді гіпертензивних тварин при дії омега-3 ПНЖК.

ВИСНОВКИ

Було досліджено експресію генів, що регулюють патологічні процеси, у міокарді тварин із серцевою недостатністю та цукровим діабетом та показано модулюючий вплив омега-3 ПНЖК та кверцетину на їхній рівень. Виявлено молекулярні мішені впливу досліджуваних сполук при розвитку серцевої недостатності різного генезу.

1. У контрольних зразках, а також у міокардах тварин із STZ-діабетом та при дії омега 3 ПНЖК та кверцетину ознак індукції мітохондріального сигнального шляху апоптозу виявлено не було.
2. Розвиток STZ-діабету призводить до різкого зростання рівня експресії гена *Cyp2e1*, деякого збільшення рівня *ILR*, та тенденції до зростання рівнів експресії генів *MYC*, *IL6* та *Col 1*.
3. Введення щурам із STZ-діабетом препарату ПНЖК із збагаченим вмістом омега-3 ПНЖК призводить до істотного зниження *IL6*, падіння рівня *ILR* та *Col 1* та деякого недостовірного зростання гена *MYC*. Особливої уваги заслуговує те, що рівень експресії гена *Cyp2e1* залишається на дуже високому рівні, не змінюючись відносно діабетичних показників.
4. Введення тваринам із STZ-діабетом кверцетину спричиняє зниження рівня експресії генів *IL6* та *Col 1*, залишає незмінним рівень *ILR*. Кверцетин викликає деяке зростання рівня *MYC*, але такі зміни не є достовірними. Рівень експресії гена *Cyp2e1*, як і у випадку дії ПНЖК, залишається на дуже високому рівні, не змінюючись відносно діабетичних показників.
5. При розвитку серцевої недостатності у гіпертензивних тварин (лінія SHR) старечого віку спостерігалось різке зростання рівнів *Cyp2e1* та *Col 1*, тенденція до зростання рівнів генів *MYC* та *ILR* порівняно із молодими SHR. Варто зазначити, що відбувається значна активація гена *MYC* у

міокарді молодих SHR порівняно із нормотензивними молодими тваринами (лінія Wistar).

6. Введення гіпертензивним тваринам старечого віку омега-3 ПНЖК призводить до різкого падіння експресії *MYC* та *Cyp2e1*, помірному зниженню *Col 1* та майже не змінює рівень *ILR*.
7. Введення гіпертензивним тваринам старечого віку кверцетину істотно знижує рівень експресії всіх досліджуваних генів. Це може вказувати на високий потенціал використовувати цей біофлавоноїд не лише як біодобавку, але і як лікі саме при розвитку серцевої недостатності, спричиненої хронічної тривалої гіпертензії.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Williams S, Pourrier M, McAfee D, Lin S, Fedida D. Ranolazine improves diastolic function in spontaneously hypertensive rats. //Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2014. – V. 306(6), P.H867-H881. doi: 10.1152/ajpheart.00704.2013.
2. Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. //Circ Res. – 2018, - V. 122(4), P. 624-638. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311586.
3. Montaigne D, Butruille L, Staels B. PPAR control of metabolism and cardiovascular functions.// Nat Rev Cardiol. – 2021, - V. 18(12), P. 809-823. doi: 10.1038/s41569-021-00569-6.
4. Lee TW, Bai KJ, Lee TI, Chao TF, Kao YH, Chen YJ. PPARs modulate cardiac metabolism and mitochondrial function in diabetes.// J Biomed Sci. – 2017, - V. 24(1), P. 5. doi: 10.1186/s12929-016-0309-5.
5. Korbecki J, Bobiński R, Dutka M. Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors. Inflamm Res. – 2019, - V. 68(6), P. 443-458. doi: 10.1007/s00011-019-01231-1.
6. Liu X, Yu Z, Huang X, Gao Y, Wang X, Gu J, Xue S. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) mediates the protective effect of quercetin against myocardial ischemia-reperfusion injury via suppressing the NF- κ B pathway // Am J Transl Res.- 2016. – V. 15, 8(12), P. 5169-5186
7. Chuang CH, Yeh CL, Yeh SL, Lin ES, Wang LY, Wang YH. Quercetin metabolites inhibit MMP-2 expression in A549 lung cancer cells by PPAR- γ associated mechanisms.//The Journal of Nutritional Biochemistry – 2016, - V. 33, P. 45-53. doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.03.011.
8. Wang M, Xiao FL, Mao YJ, Ying LL, Zhou B and Li Y. Quercetin decreases the triglyceride content through the PPAR signalling pathway in primary hepatocytes of broiler chickens// Biotechnology & Biotechnological

- Equipment, - 2019, - V. 33:1, P. 1000-1010, DOI: 10.1080/13102818.2019.1635528
9. Кожем'якін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. – К.: Авіцена, 2002. – 139 с.
 10. Maksymchuk O, Shysh A, Chashchyn M, Moibenko O. Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Alter Fatty Acid Composition of Lipids and CYP2E1 Expression in Rat Liver Tissue. *Int J Vitam Nutr Res.* 2015;85(5-6):322-328. doi: 10.1024/0300-9831/a000296.
 11. Maksymchuk O, Shysh A, Rosohatska I, Chashchyn M. Quercetin prevents type 1 diabetic liver damage through inhibition of CYP2E1. *Pharmacol Rep.* 2017;69(6):1386-1392. doi: 10.1016/j.pharep.2017.05.020.
 12. Hallbäck M, Weiss L. Mechanisms of spontaneous hypertension in rats. *Med Clin North Am.* 1977;61(3):593-609. doi: 10.1016/s0025-7125(16)31319-0.
 13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
 14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0.
 15. Cabiati M, Raucci S, Caselli C, Guzzardi MA, D'Amico A, Prescimone T, Giannessi D, Del Ry S. Tissue-specific selection of stable reference genes for real-time PCR normalization in an obese rat model. // *J Mol Endocrinol.* – 2012, - V. 48(3), P. 251-60. doi: 10.1530/JME-12-0024.
 16. Barathidasan R, Pawaiya RS, Rai RB, Dhama K. Upregulated Myc expression in N-methyl nitrosourea (MNU)- induced rat mammary tumours. // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2013, - V. 14(8), P. 4883-4889. doi: 10.7314/apjcp.2013.14.8.4883.
 17. Peinnequin, A., Mouret, C., Birot, O. *et al.* Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. // *BMC Immunol* 5, 3 (2004). <https://doi.org/10.1186/1471-2172-5-3>

18. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis.// *Annu Rev Biochem.* – 2004, -V. 73, P. 87-106. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073706
19. Camara AKS, Zhou Y, Wen PC, Tajkhorshid E, Kwok WM. Mitochondrial VDAC1: A Key Gatekeeper as Potential Therapeutic Target.// *Front Physiol.* – 2017, - 8:460. doi: 10.3389/fphys.2017.00460.
20. Lu D, Ma Y, Zhang W, Bao D, Dong W, Lian H, Huang L, Zhang L. Knockdown of cytochrome P450 2E1 inhibits oxidative stress and apoptosis in the cTnT(R141W) dilated cardiomyopathy transgenic mice.// *Hypertension.* – 2012, - V.60(1), P. 81-89. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.191478.
21. Ahuja P, Zhao P, Angelis E, Ruan H, Korge P, Olson A, Wang Y, Jin ES, Jeffrey FM, Portman M, MacLellan WR. Myc controls transcriptional regulation of cardiac metabolism and mitochondrial biogenesis in response to pathological stress in mice.// *J Clin Invest.* – 2010, - V. 120(5), P. 1494-1505. doi: 10.1172/JCI38331.
22. Westermann D, Van Linthout S, Dhayat S, Dhayat N, Escher F, Bücker-Gärtner C, Spillmann F, Noutsias M, Riad A, Schultheiss HP, Tschöpe C. Cardioprotective and anti-inflammatory effects of interleukin converting enzyme inhibition in experimental diabetic cardiomyopathy.// *Diabetes.* – 2007, - V. 56(7), P. 1834-1841. doi: 10.2337/db06-1662.
23. Negoro N, Inariba H, Inoue T, Kanayama Y, Takeda T. Expression of c-myc proto-oncogene in hearts and cultured smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl.* 1988 Dec;6(4):S128-30. doi: 10.1097/00004872-198812040-00037
24. Raghov R. An 'Omics' Perspective on Cardiomyopathies and Heart Failure.// *Trends Mol Med.* – 2016, - V. 22(9), P. 813-827. doi: 10.1016/j.molmed.2016.07.007
25. Miki T, Itoh T, Sunaga D, Miura T. Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning.// *Cardiovasc Diabetol.* – 2012, - 11:67. doi: 10.1186/1475-2840-11-67

26. Frati G, Schirone L, Chimenti I, Yee D, Biondi-Zoccai G, Volpe M, Sciarretta S. An overview of the inflammatory signalling mechanisms in the myocardium underlying the development of diabetic cardiomyopathy.// *Cardiovascular Research*, - 2017,- V. 113 (4), P. 378–388, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx011>
27. Bing O.H., Brooks W.W., Robinson K.G., Slawsky M.T., Hayes J.A., Litwin S.E., Sen S., Conrad C.H. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure // *J Mol Cell Cardiol.* – 1995. – Vol. 27, № 1. – P. 383–396
28. Ahuja P, Zhao P, Angelis E, Ruan H, Korge P, Olson A, Wang Y, Jin E, Jeffrey F, Portman M, MacLellan W. Myc controls transcriptional regulation of cardiac metabolism and mitochondrial biogenesis in response to pathological stress in mice // *J Clin Invest.* – 2010. –V.120, №5. – P.1494-1505. <https://doi.org/10.1172/JCI38331>
29. O’Connell T, Mason RP, Budoff MJ, Navar AM, Shearer GC. Mechanistic insights into cardiovascular protection for omega-3 fatty acids and their bioactive lipid metabolites // *European Heart Journal Supplements.* – 2020. - V.22 – P.J3–J20. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/suaa115>
30. Xiao G, Mao S, Baumgarten G, Serrano J, Jordan MC, Roos KP, Fishbein MC, MacLellan WR. Inducible activation of c-Myc in adult myocardium in vivo provokes cardiac myocyte hypertrophy and reactivation of DNA synthesis.// *Circ Res.* – 2001, - V. 89(12), P. 1122-1129. doi: 10.1161/hh2401.100742.
31. Liu P, Su J, Song X, Wang S. Activation of nuclear β -catenin/c-Myc axis promotes oxidative stress injury in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy.// *Biochem Biophys Res Commun.* – 2017, - V.493(4), P. 1573-1580. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.027.
32. Guan F, Yang X, Li J, Dong W, Zhang X, Liu N, Gao S, Wang J, Zhang L, Lu D. New Molecular Mechanism Underlying Myc-Mediated Cytochrome P450 2E1 Upregulation in Apoptosis and Energy Metabolism in the

- Myocardium.// J Am Heart Assoc. – 2019, -; 8(1):e009871. doi: 10.1161/JAHA.118.009871.
- 33.Schäfer A, Galuppo P, Fraccarollo D, Vogt C, Widder JD, Pfrang J, Tas P, Barbosa-Sicard E, Ruetten H, Ertl G, Fleming I, Bauersachs J. Increased cytochrome P4502E1 expression and altered hydroxyeicosatetraenoic acid formation mediate diabetic vascular dysfunction: rescue by guanylyl-cyclase activation.// Diabetes. – 2010, - V. 59(8), P. 2001-2009. doi: 10.2337/db09-1668.
34. Ren J, Pei Z, Chen X, Berg MJ, Matrougui K, Zhang Q, Zhang Y. Inhibition of CYP2E1 attenuates myocardial dysfunction in a murine model of insulin resistance through NLRP3-mediated regulation of mitophagy // Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. – 2019. – V.1 – P.206-217. doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.017
- 35.Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza LH, Li N, Reddy A, Frangogiannis NG. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling.// Am J Pathol. – 2008, - V. 173(1), P. 57-67. doi: 10.2353/ajpath.2008.070974.
36. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. //Nat Rev Cardiol. – 2014, - V. 11(5), P. 255-265. doi:10.1038/nrcardio.2014.28.
- 37.Bujak M, Frangogiannis NG. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease.// Arch Immunol Ther Exp (Warsz). – 2009, - V. 57(3), P. 165-176. doi: 10.1007/s00005-009-0024-y.
- 38.Pauschinger M, Doerner A, Remppis A, Tannhäuser R, Kühl U, Schultheiss HP, Differential myocardial abundance of collagen type I and type III mRNA in dilated cardiomyopathy: effects of myocardial inflammation,// *Cardiovascular Research*, -1998,- V.37(1), P. 123–129, [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(97\)00217-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(97)00217-4)
- 39.Lee DL, Wilson JL, Duan R, Hudson T, El-Marakby A. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Activation Decreases Mean Arterial

- Pressure, Plasma Interleukin-6, and COX-2 While Increasing Renal CYP4A Expression in an Acute Model of DOCA-Salt Hypertension. // *PPAR Res.* 2011;2011:502631. doi: 10.1155/2011/502631.
40. Chandra M, Miriyala S, Panchatcharam M. PPAR γ and Its Role in Cardiovascular Diseases.// *PPAR Res.* 2017;2017:6404638. doi: 10.1155/2017/6404638.
41. Westermann D, Rutschow S, Jäger S, Linderer A, Anker S, Riad A, Unger T, Schultheiss HP, Pauschinger M, Tschöpe C. Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism.// *Diabetes.* – 2007, - V. 56(3), P. 641-646. doi: 10.2337/db06-1163.
42. Wan YY, Cai Y, Li J, Yuan Q, French B, Gonzalez FJ, French S. Regulation of peroxisome proliferator activated receptor alpha-mediated pathways in alcohol fed cytochrome P450 2E1 deficient mice.// *Hepatol Res.* – 2001, - V. 19(2), P. 117-130. doi: 10.1016/s1386-6346(00)00089-9.
43. Patel RV, Mistry BM, Shinde SK, Syed R, Singh V, Shin HS. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent.// *Eur J Med Chem.* – 2018, - V. 155, P. 889-904. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.06.053.
44. Wagner KD, Wagner N. PPARs and Myocardial Infarction.// *Int J Mol Sci.* – 2020, - V. 21(24), P. 9436. doi: 10.3390/ijms21249436.