

# Активация митохондриальных механизмов кардиопротекции при ишемии-реперфузии изолированного сердца щурів з інсулінорезистентністю

М.Г. Козловська<sup>1,2</sup>, М.І. Василенко<sup>1,2</sup>, О.О. Гончар<sup>1</sup>, К.В. Розова<sup>1</sup>, А.Г. Портниченко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

<sup>2</sup>МЦ АМЕД НАН України, Київ; e-mail: mariia.kozlovska@biph.kiev.ua

*Дисрегуляція митохондриальних функцій може істотно порушувати енергетичний обмін у міокарді. Однак митохондриальні механізми кардиопротекції та їх порушення у разі метаболічних розладів досі недостатньо досліджені. Метою нашої роботи було охарактеризувати митохондриальні механізми кардиопротекції при ішемії-реперфузії серця щурів за умов інсулінорезистентності та гіпоксичного прекодицювання. У дорослих щурів-самців лінії Вістар викликали інсулінорезистентність вживанням високожирової дієти з 58% жиру протягом 14 діб. Гіпоксичне прекодицювання відтворювали за допомогою впливу гіпобаричної гіпоксії (380 торр) у барокамері впродовж 3 год. Для оцінки кардиопротективних ефектів через 24 год моделювали 30-хвилинну ішемію і 40-хвилинну реперфузію ізолированного серця при ізоволюмічній ретроградній перфузії за методом Лангендорфа. Визначали розмір інфаркту міокарда, показники окисного стресу і рівень експресії митохондриального білка PGC-1 $\alpha$ . Митохондрії досліджували за допомогою електронної мікроскопії. У міокарді щурів з інсулінорезистентністю відбувалося кількісне зростання всіх субпопуляцій митохондрій, активация їх внутрішньоклітинних зв'язків з іншими органелами, підвищувався рівень експресії PGC-1 $\alpha$  у лівому шлуночку. Водночас спостерігали активацию вільнорадикальних процесів у міокарді зі зростанням вмісту активних продуктів тіобарбітурової кислоти і активацию антиоксидантних механізмів, зокрема, системи глутатіону. Гіпоксичне прекодицювання збільшувало рівень експресії PGC-1 $\alpha$  у правому шлуночку, призводило до активации енергетичного метаболізму, зростання митохондриальної динаміки з елімінацією ушкоджених органел за допомогою мітофагії і біогенезу нових митохондрій на тлі зменшення митохондриальної дисфункції. Після ішемії-реперфузії у цих щурів спостерігали обмеження пошкодження митохондрій та проявів їх дисфункції. Прекодицювання сприяло зменшенню розміру інфаркту, посилювало мітопротективний, ефект в ішемізованому серці. Інсулінорезистентність сприяла інтенсифікації PGC-1 $\alpha$ -залежних митохондриальних механізмів протекції від ішемічного пошкодження в міокарді. Гіпоксичне прекодицювання так само посилювало мітопротективний ефект при інсулінорезистентності, що призводило до зменшення розміру інфаркту міокарда при ішемії-реперфузії ізолированного серця, однак антиоксидантний ефект частково втрачався.*

*Ключові слова: інсулінорезистентність; високожирова дієта; гіпоксія; пре кодицювання; ішемія-реперфузія; кардиопротекція; митохондриальна дисфункція; окисний стрес; PGC-1 $\alpha$ ; щури.*

## ВСТУП

Важливою патогенетичною ланкою ураження серця при метаболічних захворюваннях може бути нестача енергетичного забезпечення міокарда. Митохондрії відіграють фундаментальну роль у виживанні та функціонуванні кардіо-міоцитів і мають вирішальне значення для

забезпечення їх високої потреби в енергії [1].

Одним із ключових регуляторів митохондриальних функцій є коактиватор-1 (PGC-1) рецептора, активованого проліфератором пероксисом- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). PGC-1 активує митохондриальний біогенез, виконує важливі функції в динамічних властивостях митохондрій, включаючи злиття, поділ і

деградацію, які керують не тільки енергетичним метаболізмом, але й іншими клітинними подіями [2]. Субодинаця PGC-1 $\alpha$  перешкоджає окисному пошкодженню посиленням експресії широкого спектра генів, пов'язаних з антиоксидантними білками в різних клітинах. PGC-1 $\alpha$  був визнаний важливим регуляторним білком у контролі кількості серцевих мітохондрій і їх функцій у відповідь на енергетичні потреби [3].

Дисрегуляція шляху PGC-1 $\alpha$  істотно порушує гомеостаз серцевого метаболізму. Наявні відомості про дисфункцію мітохондрій при метаболічному синдромі та серцево-судинних захворюваннях, зокрема, діабетичній кардіоміопатії, вказують на необхідність вивчення участі PGC-1 $\alpha$  у розвитку патології міокарда при інсулінорезистентності (ІР), як початковому етапі розвитку метаболічних захворювань, та його можливої участі у кардіопротективних механізмах [2, 3].

Стимуляція кардіопротективних механізмів відбувається внаслідок прекодиціювання міокарда різного генезу і робить міокард менш уразливим щодо наступного ушкодження, зокрема, ішемічного [4]. Одним з перспективних підходів для індукції прекодиціювання є розроблене нами гіпоксичне прекодиціювання (ГП) за допомогою гіпоксичного впливу на цілісний організм. Однак мітохондріальні механізми у разі прекодиціювання різного генезу досі недостатньо охарактеризовані.

Мета нашої роботи: встановлення мітохондріальних механізмів кардіопротекції при ішемії-реперфузії серця щурів при інсулінорезистентності та гіпоксичному прекодиціюванні.

## МЕТОДИКА

Досліди проводили на дорослих щурах-самцях лінії Вістар масою 300–360 г. Роботу з тваринами проводили з дотриманням вимог Європейської конвенції про захист хребетних

тварин, прийнятої в Страсбурзі 1986 року, і чинного законодавства України з питань захисту піддослідних тварин ( № протоколу 1/24 від 29.02.2024 р.).

Тварин поділяли на такі групи: 1-ша контрольна – до якої ввійшли інтактні щури (n=16); до 2-ї - щури, у яких викликали прекодиціювання за допомогою дії гіпобаричної гіпоксії за добу до відбору зразків (n=16); до 3-ї - тварини, які вживали високожирову дієту (ВЖД) протягом 14 діб (n=20); до 4-ї - щури, які перебували на ВЖД та піддавалися ГП (n=20). Частина із тварин кожної групи використовували для моделювання ішемії-реперфузії ізольованого серця через 24 год після впливу ГП.

ІР викликали вживанням тваринами ВЖД (58% тваринного жиру від загальної калорійності їжі) впродовж 14 діб [5]. Розвиток ІР підтверджували за допомогою тесту толерантності до інсуліну [5, 6]. Для відтворення ГП щурів поміщали у барокамеру та «піднімали» на висоту 5600 м (380 торр) впродовж 3 год [4].

Серця вилучали з грудної клітки щурів, наркотизованих уретаном («Sigma», США) з розрахунку 1,5 г/кг. Ішемію-реперфузію ізольованого серця моделювали за допомогою установки для ізовольюмічної ретроградної перфузії ізольованого серця за методом Лангендорфа. Моделювали тотальну ішемію протягом 30 хв та реперфузію протягом 40 хв, а для дослідження розміру інфаркта – протягом 60 хв.

Зразки міокарда відбирали через 24 год після ГП, а також негайно по закінченні реперфузії ізольованого серця. Для дослідження активації окисних процесів у гомогенаті міокарда визначали накопичення вторинних продуктів переокисного окиснення ліпідів – активованих продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) [7]. Вміст відновленого глутатіону оцінювали спектрофотометрично [8]. Після ішемії-реперфузії ізольованого серця досліджували розмір інфаркту методом забарвлення трифенілтетразолієм [9].

Зразки для морфологічних досліджень відбирали з верхівки лівого шлуночка серця, проводили подвійну фіксацію за загальноприйнятою методикою. Зі зразків отримували ультратонкі зрізи (товщина 40–60 нм), які контрастували за методом Рейнольдса [10] і переглядали в електронному мікроскопі ПЕМ-125К (Україна). Морфологічні показники розраховували у 130–150 полях для кожного впливу, керуючись підходами Вейбеля [11], за допомогою програми Image Tool 3 Version (США).

Рівень експресії білка визначали у тканинах міокарда щурів методом імуноблотингу (Western blotting) відповідно до протоколів BIO-RAD Labs (США). Мембрани обробляли поліклональними антитілами PPARGC1A («Invitrogen», США, PA5-72948) і антиокислювачем імуноглобуліном G, кон'югованим з пероксидазою («Sigma», США, F0545). Мембрани сканували, визначали інтенсивність забарвлення за допомогою комп'ютерної денситометрії у програмі ImageJ (США) та представляли в умовних одиницях, нормалізуючи до контролю.

Концентрацію білка вимірювали згідно з протоколами Thermo Fisher Scientific (Великобританія) біцинхоніновим методом.

Для статистичної обробки отриманих результатів застосовували загальноприйняті методи варіаційної статистики, використовуючи для цього комп'ютерну програму GraphPad Prism (США, версія 8.1.0.325). Для оцінки груп поводити дисперсійний аналіз (ANOVA) і post hoc аналіз з поправкою Тьюкі. Результати представляли як середнє арифметичне та похибку середнього ( $M \pm m$ ). Відносні величини представляли у відсотках. Відмінність вважали статистично значущою при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При моделюванні ІР у міокарді зростала кількість продуктів окисдаивних реакцій ТБК-АП на 17,26% і вміст відновленого глутатіону – на 52,71% (рис. 1). Це може

свідчити про помірну активацію вільнорадикальних процесів у тварин з ліпідним навантаженням, причому як компенсаторний механізм антиоксидантного захисту потужно активувалася система глутатіону.

Про ефективність цієї системи може свідчити той факт, що після ішемії-реперфузії в серцях з ІР вміст ТБК-АП не зростає на відміну від його вірогідного збільшення у контрольній групі, тоді як рівень відновленого глутатіону істотно зменшувався (див. рис. 1). Подібна динаміка показників спостерігалася і після впливу ГП, хоча кардіопротективний вплив на показники окисного стресу був більш вираженим, а

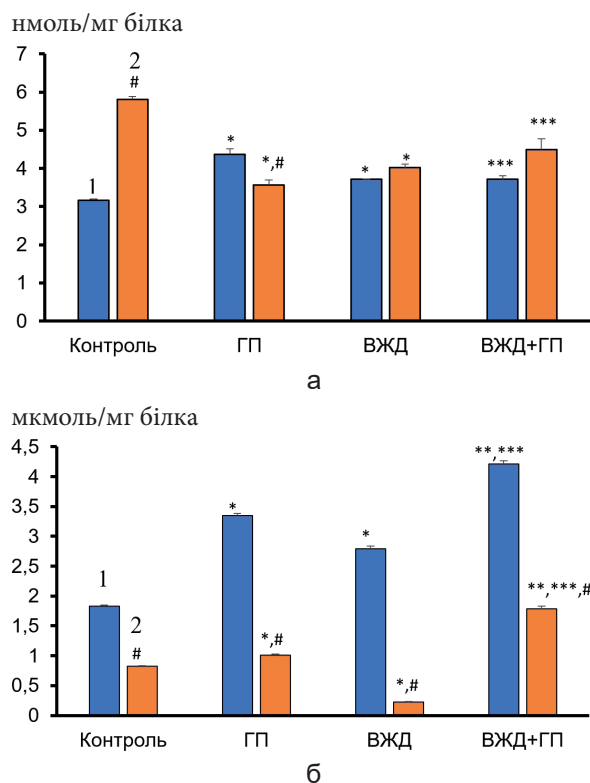


Рис. 1. Вміст ТБК-АП (а) і відновленого глутатіону (б) у міокарді щурів при моделюванні інсулінорезистентності вживанням високожирової дієти (ВЖД) та впливі гіпоксичного прекодиціювання (ГП) та зміни цих показників після ішемії-реперфузії ізольованого серця. 1 – без ішемії-реперфузії; 2 – ішемія-реперфузії. \* $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* $P < 0,05$  порівняно з ВЖД, \*\*\* $P < 0,05$  порівняно з ГП, # $P < 0,05$  порівняно з доішемічним рівнем

внесок системи глутатіону – меншим, ніж при дії на щурів ліпідного навантаження.

При дії ГП на тварин з ІР частково втрачався протективний ефект прекодиціювання щодо попередження постішемичного зростання окисного стресу. Незважаючи на максимальний доішемичний вміст відновленого глутатіону у цій групі, його використання в антиоксидантному захисті при ішемії-реперфузії було менш інтенсивним (див. рис. 1).

За даними літератури, як збільшення окиснення ліпідів, так і гіперглікемія внаслідок зменшення окиснення глюкози і порушення транспорту її в клітину, перехід на альтернативні шляхи метаболізму субстратів сприяють посиленню утворення вільнорадикальних сполук, спричиняють розвиток окисного стресу, що порушує роботу ферментів електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, погіршує енергетичний метаболізм і викликає мітохондріальну дисфункцію, яка може призвести до загибелі кардіоміоцитів і порушення роботи серця [12]. Наші дослідження також вказують, що розвиток ІР внаслідок ліпідного навантаження супроводжується зростанням окисного стресу та напруженням системи глутатіону як ланки антиоксидантного захисту.

Умови ранньої реперфузії можуть бути основною детермінантою пошкодження тканин. Реперфузія стимулює активність НАДФН-оксидази, цитохрому Р450 і циклооксигенази для збільшення та прискорення виробництва вільних радикалів. Парадоксально, але повторна оксигенація тканин накопиченими окисними субстратами роз'єднує електронно-транспортний ланцюг, що призводить до утворення вільнорадикальних продуктів [12]. Згідно з нашими результатами ІР посилює окисний стрес, але попереджує його розвиток при реперфузії. ГП сприяє зменшенню рівня окисного стресу за допомогою системи глутатіону, її внесок має суттєве значення і при ІР. Таким чином, нами отримано нові відомості про особливості розвитку та компенсації окисного стресу в

реперфузованому міокарді при ІР та участь цих механізмів у кардіопротекції при ГП.

Виявлено, що вживання ВЖД не здійснювало вірогідний вплив на розмір інфаркту після ішемії-реперфузії ізольованого серця (рис. 2). Після ГП він вірогідно зменшувався як в контролі, так і у серцях щурів з ВЖД, хоча у останніх варіабельність показника була більшою.

У літературі зустрічаються неоднозначні дані щодо впливу метаболічних порушень на розмір інфаркту міокарда. Здебільшого повідомлялося про збільшення або відсутність змін у розмірі інфаркту в тварин з діабетом 2-го типу. Збільшення площі ураження при діабеті 2-го типу автори пояснюють тим, що серця *in vivo* піддавалися шкідливому впливу високого вмісту глюкози та вільних жирних кислот, хоча в нашому дослідженні останній чинник не призводив до зростання розміру інфаркту міокарда. Водночас більш рідкісні свідчення про зменшення розміру інфаркту міокарда відносять до збереженої сигналізації інсуліну та активації захисних сигнальних шляхів на ранньому етапі розвитку діабету та ожиріння [13].

Показано, що некроз кардіоміоцитів значно збільшувався в біоптатах серця

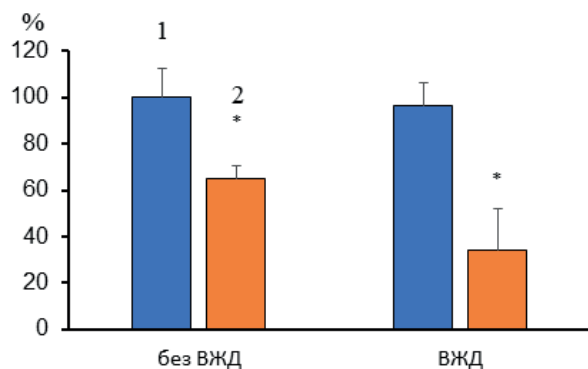


Рис. 2. Розмір інфаркту міокарда щурів при моделюванні інсулінорезистентності вживанням високожирової дієти (ВЖД) та впливі гіпоксичного прекодиціювання (ГП), нормалізований до показників у серцях контрольних щурів без ВЖД. 1 – контроль, 2 – ГП. \* $P < 0,05$  порівняно з контролем

пацієнтів з діабетом, підтверджуючи первинне порушення толерантності міокарда до ішемічно-реперфузійного пошкодження [12]. Порівняно з нашими результатами можна прослідкувати патологічні зміни: ІР не впливала на розмір інфаркту, а діабет призводив до зменшення толерантності міокарда до ішемії, збільшення частоти розвитку постінфарктної серцевої недостатності і збільшенні смертності після інфаркту в 2–4 рази [12].

При дослідженні ультраструктури кардіомиоцитів було виявлено, що у міокарді інсулінорезистентних тварин спостерігалось кількісне зростання субсарколемальної (на 14%) та інтраміофібрилярної (на 28%) субпопуляцій мітохондрій, збереження їх функції та активації внутрішньоклітинних зв'язків з іншими органелами. Покращення стану мітохондріального апарату може бути пов'язано з переходом цих органел на вживання ліпідних субстратів завдяки проявам ліпідної інфільтрації кардіомиоцитів при ВЖД. При ІР у щурів спостерігався сприятливий вплив ліпідного навантаження щодо попередження мітохондріальної дисфункції у реперфузованих серцях.

ГП призводило до зростання мітохондріальної динаміки в міокарді з елімінацією ушкоджених органел через мітофагію біогенез нових мітохондрій. ГП у тварин з ІР відзначалося активацією мітохондріального апарату міокарда та енергетичного метаболізму, відсутністю мітохондріальної дисфункції та попереджувало зростання кількості пошкоджених мітохондрій після ішемії-реперфузії. Таким чином, ІР при вживанні ВЖД супроводжувалася зростанням мітопротекції в міокарді. При цьому ГП посилювало мітопротективний ефект порівняно з таким в інтактному міокарді [13].

У нечисленних дослідженнях ГП, зокрема на мишах [14], ультраструктура міокарда і зміни мітохондріального апарату не вивчалися. Переважна більшість досліджень змін мітохондрій у міокарді при метаболічних

розладах стосується цукрового діабету. Так, виявлено фрагментацію мітохондрій при діабеті 2-го типу та збільшення розмірів ліпідних крапель, але зі зменшенням їхньої кількості [15]. Також відзначено фрагментацію мітохондрій при діабеті 2-го типу і руйнування крист, набряк цих органел, посилення мітохондріального поділу в міокарді хворих на діабет [1]. При предіабеті виявлено менші розміри мітохондрій та їхню більш сферичну форму порівняно з контрольними тваринами, що вказує на інтенсифікацію процесів поділу [16]. У дослідженнях на моделях діабету 2-го типу зі вживанням ВЖД показано незбалансовану мітохондріальну динаміку щодо процесів поділу, оскільки щільність серцевих мітохондрій була збільшеною, але водночас зменшувалася площа цих органел. На такій самій діабетичній моделі показано зменшення розміру крист в інтраміофібрилярних мітохондріях [16]. Незважаючи на відмінність цих моделей від нашої, зокрема, більшими порушеннями вуглеводного і ліпідного метаболізму, спостерігається подібність результатів щодо активації мітохондріального апарату, але з розвитком діабету зростає декомпенсація патологічних проявів і з боку метаболізму, і з боку мітохондріального апарату, що може бути ланкою розвитку кардіоміопатії [15–17].

Рівень експресії білка PGC-1 $\alpha$  визначали у лівому та правому шлуночках серця. Динаміка показників вказує, що залучення цього білка у мітохондріальну регуляцію при ГП та ішемії-реперфузії відбувалося лише в інсулінорезистентних серцях (рис. 3). У правому шлуночку, де вихідний рівень експресії PGC-1 $\alpha$  був вірогідно вищий (у 3,43 рази  $P < 0,05$ ) зміни показників інтенсифікувалися при впливі ГП на міокард з ІР (див. рис. 3).

Одержані результати вказують, що білок PGC-1 $\alpha$  відіграє більшу регуляторну роль у правому шлуночку, ніж у лівому. При ліпідному навантаженні цей білок дещо збільшує свою експресію в лівому шлуночку,

що вказує на залучення PGC-1 $\alpha$  в регуляцію ліпідного та вуглеводного обміну. Натомість ГП не мало істотного впливу на рівень PGC-1 $\alpha$  в обох шлуночках інтактного серця, що не підтримує припущення про його участь у прекодиціюванні. Однак на тлі ІР ГП призводило до значного зростання рівня експресії білка PGC-1 $\alpha$  у правому шлуночку, що може вказувати на більшу напруженість енергетичного метаболізму при ІР і підключення додаткових механізмів кардиопротекції. Така реакція може відбуватися через більш виражену і швидшу реактивність захисних механізмів у відповідь на гіпоксичні впливи в цьому відділі серця.

Ефекти гіпоксії на активність PGC-1 $\alpha$  можуть варіювати залежно від активації тих чи інших сигнальних шляхів у відповідь на

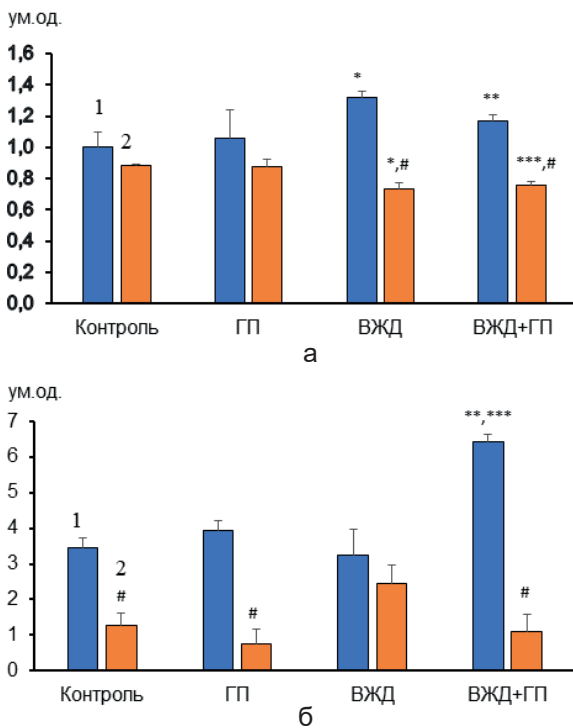


Рис. 3. Рівень експресії PGC-1 $\alpha$  у лівому (а) і правому (б) шлуночках серця шурів при моделюванні інсулінорезистентності вживанням високожирової дієти (ВЖД) та впливі гіпоксичного прекодиціювання (ГП) та зміни цих показників після ішемії-реперфузії ізолированного серця. 1 – без ішемії-реперфузії; 2 – ішемія-реперфузія. \* $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* $P < 0,05$  порівняно з ВЖД, \*\*\* $P < 0,05$  порівняно з ГП, # $P < 0,05$  порівняно з ішемією-реперфузією

нестачу кисню, оскільки кіназа AMPK активує PGC-1 $\alpha$ , а кінази Akt, GSK-3 $\beta$  та S6K1 пригнічують останню [2]. Помірний вплив гіпоксії, який застосовується під час ГП, не призводить до активації AMPK [4, 14]. Водночас, встановлено, що застосований режим ГП посилює експресію та активацію у міокарді цитопротективної кінази Akt [18], яка є інгібіторною щодо PGC-1 $\alpha$ . З огляду на ці міркування, ГП у інтактних тварин не повинно викликати значної активації PGC-1 $\alpha$ . Натомість, при ІР виявлене зростання рівня експресії цього білка вказує на зміну співвідношення цих регуляторів у бік зростання впливу AMPK. Це може свідчити, що комбінація ІР та ГП посилює енергетичний дефіцит в міокарді і підвищує концентрацію АДФ, яка активує AMPK. Активация AMPK збільшує рівень експресії PGC-1 $\alpha$  і викликає його фосфорилування, в підсумку покращуючи функцію мітохондрій, енергетичний метаболізм і зменшуючи ІР. Таким чином, зростання рівня експресії PGC-1 $\alpha$  при комбінації ВЖД і ГП є компенсаторним механізмом для покращення енергетичного метаболізму міокарда і обмеження ІР [17].

Відомо, що у відповідь на стрес відбувається ядерна деградація PGC-1 $\alpha$  [18]. Це пояснює зниження рівня експресії цього білка в міокарді після ішемії-реперфузії в нашому експерименті. Такі самі ефекти описано при дії пероксиду водню або при голодуванні [19]. За нашими даними, відсутність постреперфузійного зниження рівня експресії PGC-1 $\alpha$  у групі з ВЖД супроводжується меншими проявами окисного стресу, що вказує на залежність цих параметрів при ІР.

PGC-1 $\alpha$  відіграє ключову роль у координації окиснення внутрішньоклітинних жирних кислот із ремоделюванням мітохондрій. Також є свідчення, що зростання рівня експресії PGC-1 $\alpha$  підвищує митохондриальний біогенез сприянням транскрипції митохондриальних генів [20]. Зростання біогенезу митохондрій ми спостерігали у шурів з ІР

і ще більшою мірою у тварин з ГП на тлі ВЖД із кращим збереженням структури мітохондрій при гіпоксичному впливі та ішемічному ураженні, що вказує на PGC-1 $\alpha$ -опосередкований захисний ефект щодо компенсації мітохондріальної дисфункції при IP і підтримання цілісності мітохондрій при гіпоксії або ішемії.

## ВИСНОВКИ

IP, яка розвивалася внаслідок ліпідного навантаження, супроводжувалось зростанням мітопротекції і антиоксидантного захисту, опосередкованого системою глутатіону, в міокарді.

ГП посилювало мітопротективний ефект в серці з IP порівняно з таким в інтактному міокарді, що призводило до зменшення розміру інфаркту міокарда при ішемії-реперфузії ізольованого серця, однак антиоксидантний ефект частково втрачався.

Зростання рівня експресії PGC-1 $\alpha$  у шлуночках серця при IP та впливі ГП сприяло активації кардіопротективних PGC-1 $\alpha$  опосередкованих механізмів, а саме, стимуляції мітохондріального біогенезу, переходу мітохондрій на вживання інших енергетичних субстратів, обмеження окисного стресу. Це свідчить, що IP сприяла інтенсифікації PGC-1-залежних мітохондріальних механізмів протекції від ішемічного пошкодження в міокарді.

*Робота підтримана програмою «Науково-дослідні роботи молодих учених НАН України 2023-2024 рр.», проєкт «Молекулярні механізми розвитку інсулінорезистентності та перебудови енергетичного обміну при метаболічному синдромі».*

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.*

**M.G. Kozlovska<sup>1,2</sup>, M.I. Vasylenko<sup>1,2</sup>,  
O.O. Gonchar<sup>1</sup>, K.V. Rozova<sup>1</sup>,  
A.G. Portnychenko<sup>1,2</sup>**

## ACTIVATION OF MITOCHONDRIAL CARDIOPROTECTION MECHANISMS DURING ISCHEMIA-REPERFUSION OF ISOLATED RAT HEARTS WITH INSULIN RESISTANCE

<sup>1</sup>*Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv;*

<sup>2</sup>*MC AMED NAS of Ukraine, Kyiv;*

*e-mail: mariia.kozlovska@biph.kiev.ua*

Dysregulation of mitochondrial functions can significantly disrupt energy metabolism in the myocardium. However, mitochondrial mechanisms of cardioprotection and their disruption in metabolic disorders are still insufficiently studied. The aim of the our work was to characterize mitochondrial mechanisms of cardioprotection in ischemia-reperfusion of the rat heart under conditions of insulin resistance and hypoxic preconditioning. Adult male Wistar rats were induced to insulin resistance by consuming a high-fat diet with 58% fat for 14 days. Hypoxic preconditioning was reproduced by exposure to hypobaric hypoxia (360 Torr) in a pressure chamber for 3 hours. To assess the cardioprotective effects, 30-minute ischemia and 40-minute reperfusion of the isolated heart were simulated after 24 hours with isovolumic retrograde perfusion according to the Langendorff method. The size of the myocardial infarction, oxidative stress indicators and the level of expression of the mitochondrial protein PGC-1 $\alpha$  were determined. Mitochondria were examined using electron microscopy. In the myocardium of insulin-resistant rats, there was a quantitative increase in all mitochondrial subpopulations, activation of their intracellular connections with other organelles, and an increase in the level of PGC-1 $\alpha$  expression in the left ventricle. At the same time, activation of free radical processes in the myocardium was observed with an increase in the content of TBA-AP and activation of antioxidant mechanisms, in particular, the glutathione system. Hypoxic preconditioning increased the level of PGC-1 $\alpha$  expression in the right ventricle, led to the activation of energy metabolism, increased mitochondrial dynamics with the elimination of damaged organelles by mitophagy and biogenesis of new mitochondria against the background of a decrease in mitochondrial dysfunction. After ischemia-reperfusion in the myocardium of insulin-resistant rats, limitations in mitochondrial damage and manifestations of their dysfunction were observed. Preconditioning contributed to a decrease in infarct size, enhanced the mitoprotective effect in the ischemic heart. Insulin resistance contributed to the intensification of PGC-1 $\alpha$ -dependent mitochondrial mechanisms of protection against ischemic damage in the myocardium. Hypoxic preconditioning enhanced the myoprotective effect in insulin-resistant hearts compared with intact myocardium, leading to a reduction in myocardial infarct size during isolated heart ischemia-reperfusion, but the antioxidant effect was partially lost.

Key words: insulin resistance; high-fat diet; hypoxia; preconditioning; ischemia-reperfusion; cardioprotection; mitochondrial dysfunction; oxidative stress; PGC-1 $\alpha$ ; rats.

## REFERENCES

- Li J, Li J, Chen Y, Hu W, Gong X, Qiu H, Chen H, Xin Y, Li H. The Role of Mitochondria in Metabolic Syndrome-Associated Cardiomyopathy. *Oxid Med Cell Longev*. 2022 Jun 23;2022:9196232. doi: 10.1155/2022/9196232.
- Qian L, Zhu Y, Deng C, Liang Z, Chen J, Chen Y, Wang X, Liu Y, Tian Y, Yang Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) family in physiological and pathophysiological process and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Mar 1;9(1):50. doi: 10.1038/s41392-024-01756-w.
- Actis Dato V, Lange S, Cho Y. Metabolic flexibility of the heart: the role of fatty acid metabolism in health, heart failure, and cardiometabolic diseases. *Int J Mol Sci*. 2024 Jan 19;25(2):1211. doi: 10.3390/ijms25021211.
- Portnychenko AG, Vasylenko MI, Harmatina OYu, Drevytska TI, Portnichenko VI. Myocardial preconditioning: New approaches and molecular mechanisms. Portnychenko A.G., editor. Kyiv: Znannia Ukrainy; 2019 [Ukrainian].
- Portnychenko AG, Vasylenko MI, Aliiev RB, Kozlovska MG, Zavhorodnii MO, Tsapenko PK, Rozova KV, Portnichenko VI. The prerequisites for the development of type 2 diabetes or prediabetes in rats fed a high-fat diet. *Regul Mech Biosyst*. 2023;14(1):16-22. doi.org/10.15421/022303.
- Moro C, Magnan C. Revisited guidelines for metabolic tolerance tests in mice. *Lab Animal*. 2024 Nov 25: 16-25. doi.org/10.1038/s41684-024-01473-5.
- Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*. 1978 May;86(1):271-8. doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1.
- Gonchar OO, Karaban IM, Karasevich NV, Bratus LV, Mankovska IM. Cerebrolysin administration counteracts elevated oxidative stress in blood of patients with Parkinson's disease. *Fiziol Zh*. 2022; 68(4):20-27.
- Heusch G. Myocardial ischemia: lack of coronary blood flow, myocardial oxygen supply-demand imbalance, or what? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019 Jun 1;316(6):H1439-H1446. doi: 10.1152/ajpheart.00139.2019.
- Fuchs M, Ehlers K, Will T, van Bel AJ. Immunolocalization indicates plasmodesmal trafficking of storage proteins during cambial reactivation in *Populus nigra*. *Ann Bot*. 2010 Sep;106(3):385-94. doi: 10.1093/aob/mcq130.
- Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol*. 1969;26:235-302. doi: 10.1016/s0074-7696(08)61637-x.
- Tsapenko PK, Vasylenko MI, Aliiev RB, Zavgorodniy MO, Kozlovska MG, Topchaniuk LYa, et al. Effects of high-fat diet on the development of insulin resistance and metabolic syndrome in rats. *Ukr J Med Biol Sport* 2020;5(3):441-444. doi.org/10.26693/jmbs05.03.441
- Ansley DM, Wang B. Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart. *J Pathol*. 2013 Jan;229(2):232-41. doi: 10.1002/path.4113.
- Xi L, Tekin D, Erdal Gursoy, Salloum FN, Levasseur JE, Kukreja RC. Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia. 2002 Jul 1;283(1):H5-12. doi.org/10.1152/ajpheart.00920.2001
- Nakamura E, Aoki T, Endo Y, Kazmi J, Hagiwara J, Kuschner CE, et al. Organ-specific mitochondrial alterations following ischemia-reperfusion injury in post-cardiac arrest syndrome: A comprehensive review. *life (Basel)*. 2024 Apr 5;14(4):477. doi: 10.3390/life14040477.
- Dikalov S, Panov A, Dikalova A. Critical Role of Mitochondrial Fatty Acid Metabolism in Normal Cell Function and Pathological Conditions. *Int J Mol Sci*. 2024 Jun 12;25(12):6498. doi: 10.3390/ijms25126498.
- Penna C, Andreadou I, Aragno M, Beauloye C, Bertrand L, Lazou A, et al. Effect of hyperglycaemia and diabetes on acute myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischaemic conditioning protocols. *Brit J of Pharmacol*, 2020, 177(23), 5312-35. doi.org/10.1111/bph.14993
- Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Feb;19(2):121-135. doi: 10.1038/nrm.2017.95.
- Anderson RM, Barger JL, Edwards MG, Braun KH, O'Connor CE, Prolla TA, Weindruch R. Dynamic regulation of PGC-1 $\alpha$  localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. *Aging Cell*. 2008 Jan;7(1):101-11. doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00357.x.
- Larson-Casey JL, Gu L, Davis D, Cai GQ, Ding Q, He C, Carter AB. Post-translational regulation of PGC-1 $\alpha$  modulates fibrotic repair. *FASEB J*. 2021 Jun;35(6):e21675. doi: 10.1096/fj.202100339R.

*Матеріал надійшов до редакції 03.11.2024*