International Journal of Endocrinology

Експериментальна ендокринологія
/Experimental Endocrinology/

УДК 615.252.349.7-06:616-007.61-06:616-056.5]-092.9 DOI: 10.22141/2224-0721.14.7.2018.148779

Пасєчко Н.В., Лой Г.Я., Корда М.М., Олещук О.М.
ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України», м. Тернопіль, Україна

Роль експресії гена Foxo1 у механізмі антигіпертрофічної дії метформіну в кардіоміоцитах

For cite: Mìžnarodnij endokrinologìčnij žurnal. 2018;14(7):705-711. doi: 10.22141/2224-0721.14.7.2018.148779

Резюме. ***Актуальність.*** *Діабетична кардіоміопатія є провідною причиною смертності при цукровому діабеті (ЦД) 2-го типу. Однією з основних патоморфологічних ознак розвитку діабетичної кардіоміопатії розглядається гіпертрофія кардіоміоцитів. Метформін, засіб вибору першої лінії для лікування ЦД 2-го типу, окрім антигіперглікемізуючих, викликає кардіопротективні ефекти. Проте механізм дії препарату в кардіоміоцитах вивчений недостатньо.* ***Мета.*** *Вивчення ролі експресії гена Foxo1 у механізмі антигіпертрофічної дії метформіну в кардіоміоцитах.* ***Матеріали та методи.*** *H9C2 клітини були трансфектовані за допомогою siRNA Foxo1 та siRNA negative control. Клітини були депривовані у 0% медіумі протягом 24 годин, за 30 хвилин до стресу проліковані метформіном (5 mM) і поміщені у гіпоксичний бокс на 16 годин із подальшою реоксигенацією протягом чотирьох годин. Площі клітин визначені за допомогою програми ImageJ. Ефективність трансфекції підтверджено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.* ***Результати.*** *При нормальному функціонуванні гена Foxo1 метформін проявляє виражену антигіпертрофічну дію в умовах гіпоксії. Проте блокування експресії Foxo1 позбавляє препарат цього ефекту і викликає гіпертрофію H9C2 клітин у всіх умовах експерименту.* ***Висновки.*** *Виражена гіпертрофічна відповідь у групі клітин, трансфектованих за допомогою siRNA Foxo1, які культивувалися в умовах гіпоксії і були проліковані метформіном, може бути результатом одного з механізмів: а) метформін запобігає збільшенню розмірів клітин через Foxo1-залежний механізм, тому блокування гена Foxo1 призводить до втрати препаратом антигіпертрофічного ефекту; б) метформін захищає від гіпоксії незалежно від Foxo1-шляху, тому виражена гіпертрофія лікованих метформіном клітин, інкубованих у гіпоксії, є наслідком гальмування експресії Foxo1, що є потужним гіпертрофічним стимулом. Отже, з'ясування кардіопротективного механізму дії метформіну залишається надзвичайно актуальним питанням і потребує подальшого вивчення.*

Ключові слова: *діабетична кардіоміопатія; гіпертрофія; H9C2 клітини; метформін; Foxo1*

Вступ

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) визначає цукровий діабет (ЦД) як одне з чотирьох пріоритетних неінфекційних захворювань, оскільки число його випадків і поширеність невпинно зростають. У 2014 році від ЦД страждали 422 мільйони дорослого населення планети [1]. На ЦД 2-го типу припадає 90–95 % усіх випадків захворювання [2].

ЦД призводить до формування мікро- та макросудинних уражень, негативно впливає практично на всі тканини в організмі, викликає виражену дисфункцію внутрішніх органів із подальшою інвалідизацією хворих, яка, у свою чергу, стає соціальним та економічним тягарем у всьому світі. У структурі смертності від серцево-судинних захворювань (ССЗ) понад 65 % становлять випадки, пов'язані з ЦД [3].

Діабетичне ураження серця найчастіше проявляється у вигляді ішемічної хвороби серця (ІХС), серцевої вегетативної нейропатії та діабетичної кардіоміопатії (ДКМ) [3]. Саме діабетична кардіоміопатія є однією з основних причин термінальної стадії серцевої недостатності (СН), що часто призводить до раптової зупинки серця та смерті [4]. А з-поміж усіх інших коморбідних із СН станів найвищою була смертність при ДКМ, яка спостерігалася у 60 % пацієнтів [5]. Фактична поширеність ДКМ ще не вста-

© «Міжнародний ендокринологічний журнал» / «Международный эндокринологический журнал» / «International Journal of Endocrinology» («Mìžnarodnij endokrinologìčnij žurnal»), 2018
© Видавець Заславський О.Ю. / Издатель Заславский А.Ю. / Publisher Zaslavsky O.Yu., 2018

Для кореспонденції: Лой Галина Ярославівна, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського», Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46000, Україна; e-mail: loy@tdmu.edu.ua, контактний тел.: + 38(097)8975239.
For correspondence: H. Loi, State Institution of Higher Education "I. Horbachevsky Ternopil State Medical University", Maidan Voli, 1, Ternopil, 46001, Ukraine; e-mail: loy@tdmu.edu.ua, contact phone: + 38(097)8975239.

новлена через відсутність достатньої кількості даних про дослідження серед різних груп населення, які страждають від ЦД [3].

Патогенез і патофізіологія ДКМ не вивчені достатньо. Відомо, що для цього виду кардіоміопатії характерною є фокальна втрата клітин внаслідок мікросудинного спазму та реперфузного ушкодження з подальшим розвитком фокального фіброзу та реактивної гіпертрофії у відповідь на некроз міокарда [6]. Гістологічно ДКМ характеризується апоптозом, гіпертрофією та фіброзом, функціонально-кардіальною дисфункцією, що виникають незалежно від судинних або серцевих захворювань [7].

Вважається, що хронічна гіперглікемія відіграє центральну роль у розвитку патології. Разом із тим численні комплексні (на початку компенсаторні, а потім патологічні) механізми, взаємодія багатьох молекулярних і метаболічних процесів у міокарді та плазмі крові сприяють патогенезу ураження [3]. Саме гіперглікемія спричиняє значні метаболічні та молекулярні зміни у кардіоміоцитах. Підвищений метаболізм глюкози призводить до посилення оксидативного стресу шляхом утворення активних форм кисню у мітохондріях [8]. Надмірна продукція супероксиду мітохондріальним дихальним ланцюгом викликає зниження скоротливої здатності міокарда, що зрештою призводить до фіброзу кардіоміоцитів [9], ушкодження ДНК і прискореного апоптозу кардіоміоцитів [3]. У свою чергу, гіперінсулінемія є важливим тригером розвитку гіпертрофії серця при ДКМ [10].

Гіпертрофія міокарда є однією з найбільш поширених ознак ДКМ [6]. Характерною рисою гіпертрофованих кардіоміоцитів є збільшення їх розмірів порівняно з нормальними клітинами. Дослідження культивованих *in vitro* неонатальних кардіоміоцитів показали, що збільшення розмірів кардіоміоцитів під впливом гіпертрофічних стимулів пов'язане з посиленням саркомерогенезу та збільшенням експресії натрійуретичних пептидів [9].

Як і в попередні роки, у новому алгоритмі терапії ЦД 2-го типу Американської діабетичної асоціації зразка 2018 року пероральний цукрознижуючий засіб метформін із групи бігуанідів рекомендований як препарат першої лінії для стартової фармакотерапії ЦД 2-го типу у дітей і дорослих за відсутності протипоказань. Крім того, метформін залишається препаратом вибору з точки зору ефективності та безпеки для монотерапії ЦД 2-го типу [10]. Найбільшими його клінічними перевагами є те, що він не викликає гіпоглікемій і збільшення маси тіла. Метформін характеризується високою антигіперглікемічною ефективністю і має високий профіль серцево-судинної безпеки [11].

Попри те, що препарат у клініці почали застосовувати ще в 1950-х роках, точний механізм дії метформіну досі залишається недостатньо вивченим [12]. Насамперед метформін підвищує чутливість рецепторів до інсуліну, що призводить до зниження його рівня у плазмі крові натще та зменшення інсулінорезистентності [13], підвищує рівень глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1) у плазмі крові та індукує експресію гена інкретинового рецептора острівця Лангерганса через залежний від пероксисомних проліфератор-активованих рецепторів (PPAR)-α механізм [14].

Проте основна роль відводиться здатності метформіну знижувати продукцію глюкози печінкою шляхом пригнічення глюконеогенезу [15]. Вивчаються також інші можливі інгібіторні механізми на печінковий глюконеогенез, зокрема зміни ферментної активності або зменшення захвату печінкою глюконеогенних субстратів.

Упродовж багатьох років молекулярна мішень метформіну залишалася невідомою [12], поки група вчених [16] не дослідила, що активація AMP-активованої протеїнкінази (AMPK) була тісно пов'язана з плейотропними ефектами метформіну.

AMPK є багатокомпонентним ферментом, а саме основним регулятором ліпідних шляхів біосинтезу, завдяки своїй ролі у фосфорилюванні й інактивації ключових ензимів, таких як ацетил-KoA-карбоксилаза. AMPK-активована протеїнкіназа вважається сенсором енергетичного обміну, оскільки вона є чутливою до клітинного співвідношення АМФ : АТФ [17]. Будучи активованою, AMPK переводить клітини з анаболічного до катаболічного стану, виключаючи синтетичні шляхи, що споживають АТФ, і відновлює енергетичний баланс. Як основний внутрішньоклітинний датчик енергії AMPK стає важливою мішенню при метаболічних порушеннях, особливо при ЦД 2-го типу та захворюваннях печінки. Через це гіпоглікемізуючий ефект метформіну пов'язаний з активацією печінкової AMPK [18].

У дослідженнях останніх років вивчаються нові альтернативні шляхи, що, ймовірно, залучені до контролю метформіном гомеостазу глюкози [19]. Наприклад, метформін пригнічує активність AMP-деамінази (AMPD). Виключення експресії AMPD нівелювало стимуляцію метформіном транспортування глюкози [20].

Хоча більшість досліджень показують, що метформін проявляє свої кардіопротективні властивості шляхом активації АМФ-активованої протеїнкінази [21], доведено, що наявні інші потенційні механізми дії препарату, незалежні від цього ферменту [22].

Foxo-група протеїнів включає Foxo1, Foxo3a, Foxo4 та Foxo6, які забезпечують різноманітні фізіологічні та патологічні функції, регулюючи експресію генів, пов'язаних із апоптозом, зупинкою клітинного циклу, репарацією ушкодженої ДНК, метаболізмом глюкози, стійкістю до оксидативного стресу та іншими функціями [23].

Отже, ДКМ, основними чинниками розвитку якої є гіперглікемія та гіпоксія, посідає перше місце серед причин смертності у пацієнтів із ЦД 2-го типу. Тому вивчення цього діабетичного ускладнення та його патоморфологічних ознак, зокрема гіпертрофії, апоптозу, некрозу, фіброзу та запалення, залишається надзвичайно актуальним. Необхідно детальніше вивчити шляхи, завдяки яким метформін проявляє свою захисну дію на серцеві клітини.

Мета дослідження: дослідити, чи залучена експресія гена Foxo1 до механізму антигіпертрофічної дії метформіну в кардіоміоцитах.

Матеріали та методи

Експеримент був проведений на H9C2 культурі клітин (кардіоміобласти ембріонів щурів). H9C2 клітини були культивовані у середовищі Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies) із додаванням 10% сироватки (Fetal Bovine Serum, Life Technologies) та пеніцилін-стрептоміцинової суміші (Penicillin-Streptomycin 10,000 U/mL, Life Technologies) в CO_2-інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5% CO_2 і вологості повітря 95 %. Коли конфлюентність клітин сягла 40–60 %, було проведено трансфекцію клітин за допомогою Foxo1 small interfering RNA (siRNA) та siRNA negative control (NC) у кінцевій концентрації 200 nmol/L з використанням Lipofectamine 2000 transfection reagent (Life Technologies) відповідно до інструкції виробника. Через 48 години подальшої інкубації конфлюентність клітин сягала 80–90 % і вони були готові до подальших експериментів.

Щоб здійснити депривацію клітин, живильне середовище було замінене на Dulbecco's Modified Eagle's medium із пеніцилін-стрептоміциновою сумішшю, але без додавання сироватки (0% medium). Через 24 години, за 30 хвилин до стресу (гіпоксії), клітини були проліковані метформіном у кінцевій концентрації 5 mM.

Щоб викликати гіпоксію, клітини були поміщені у гіпоксичний бокс (5% CO_2, 1% O_2, balance N_2) при 37 °C на 16 годин із подальшою реоксигенацією протягом чотирьох годин.

Щоб визначити площу клітин, випадковим чином було обрано по 3 поля зору для кожної умови і використано програму ImageJ. Ефективність трансфекції було підтверджено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

Дані наведені у вигляді mean ± SEM. Статистична обробка здійснена за допомогою one-way ANOVA followed by a Bonferroni's post hoc test у програмі GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, Inc).

Результати

На рис. 1 продемонстровано, що культивування кардіоміоцитів ембріонів щура в умовах гіпоксії (H) вірогідно викликає збільшення їх площі як у випад-

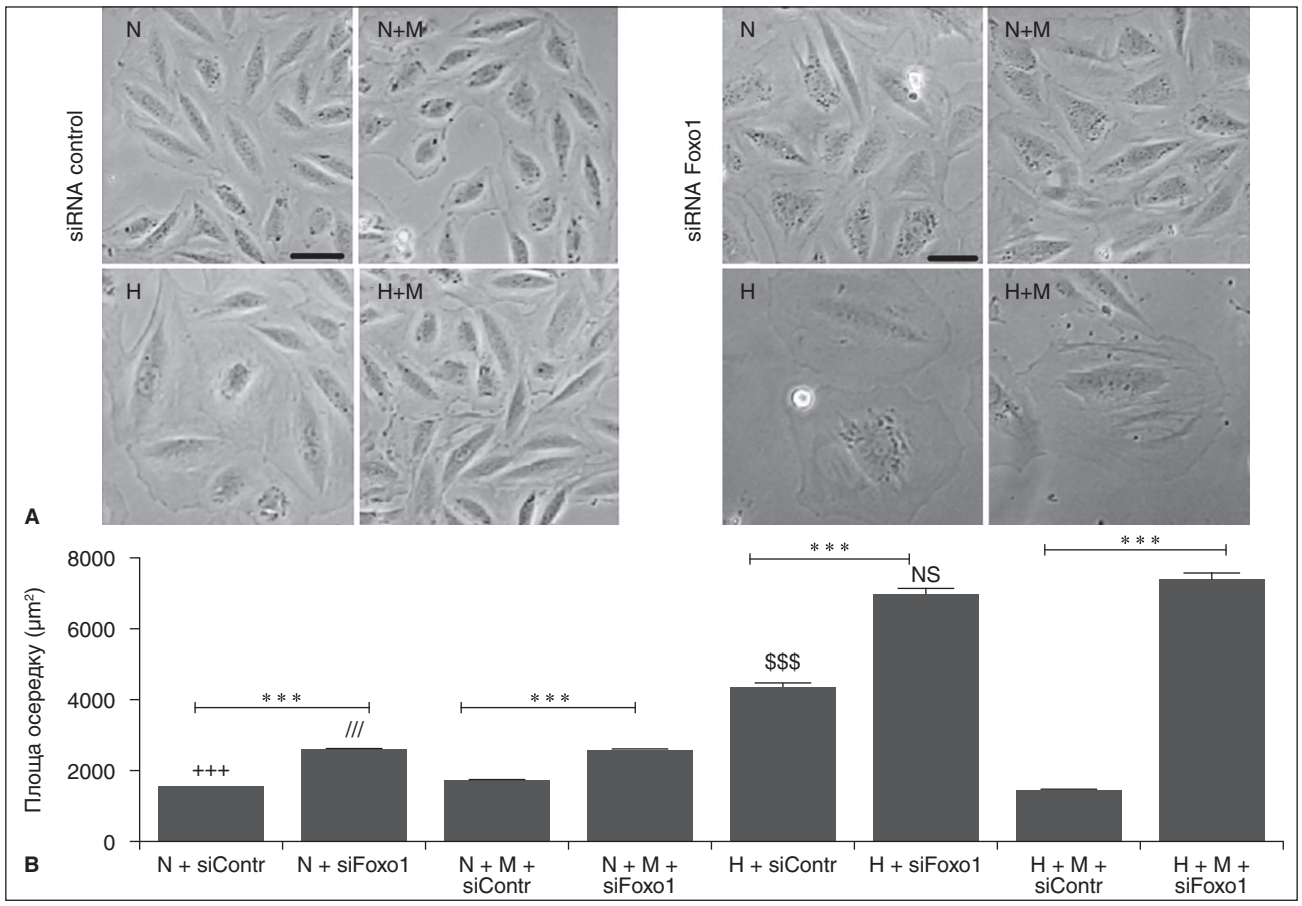

Рисунок 1. Вплив метформіну на площу H9C2 клітин при індукованому гіпоксією стресі при фізіологічній або блокованій експресії гена Foxo1: A — H9C2 клітини трансфектовані за допомогою контрольної siRNA (siControl) або siRNA Foxo1 (siFoxo1) і проліковані 5 мМ метформіном. Для визначення площі клітин використано програму ImageJ. Шкала — 100 μM; B — морфометрія від (A)

Примітки: *** — p < 0,0001; +++ — p < 0,0001 vs H + siControl; /// — p < 0,0001 vs H + siFoxo1; $$$ — p < 0,0001 vs H + M + siControl; NS vs H + M + siFoxo1; N — група клітин, культивованих в умовах нормоксії; N + M — група клітин, культивованих в умовах нормоксії і пролікованих метформіном; H — група клітин, культивованих в умовах гіпоксії; H + M — група клітин, культивованих в умовах гіпоксії і пролікованих метформіном; + siControl — трансфекція здійснена за допомогою siRNA negative control; + siFoxo1 — трансфекція здійснена за допомогою siRNA Foxo1; NS — немає вірогідної різниці

ку фізіологічної експресії гена Foxo1 (при застосуванні siRNA Control), так і при його блокуванні за допомогою siRNA Foxo1.

Лікування метформіном вірогідно захищає H9C2 клітини від індукованої гіпоксією гіпертрофії при нормальному функціонуванні гена Foxo1 (H + M + siRNA Control).

Проте у випадку блокування гена Foxo1 (при трансфекції H9C2 клітин за допомогою siRNA Foxo1) препарат метформін втрачав свою властивість запобігати збільшенню площі кардіоміоцитів в умовах гіпоксії (H + M + siRNA Foxo1).

Зважаючи на ці результати, можна було б припустити, що Foxo1-шлях є потенційним механізмом, через який метформін реалізує свій антигіпертрофічний ефект у H9C2 клітинах, оскільки виключення експресії гена Foxo1 призводить до втрати препаратом здатності запобігати збільшенню площі кардіоміоцитів під впливом гіпоксії.

Проте блокування гена Foxo1 призвело до гіпертрофії H9C2 клітин і в усіх інших умовах, навіть при нормоксії (N + siRNA Foxo1 та N + M + siRNA Foxo1). Це свідчить про те, що виключення Foxo1-експресії провокує збільшення площі клітин, тобто нормальне функціонування гена є обов'язковою умовою для підтримки фізіологічних розмірів кардіоміоцитів.

Як показано на рис. 2, рівень експресії гена Foxo1 після трансфекції H9C2 клітин із siRNA Foxo1 вірогідно зменшився. Незначну експресію гена Foxo1 у групах трансфектованих із siRNA Foxo1 клітин можна пояснити тим, що до етапу трансфекції клітини були у конфлюентності 40–60 % і експресували ген Foxo1.

Обговорення

Культури кардіоміоцитів, отримані зазвичай від новонароджених щурів, широко використовуються для дослідження клітинних і молекулярних змін, що лежать в основі гіпертрофічної відповіді. Культивування кардіоміоцитів дозволило створити доступну, з хорошими характеристиками *in vitro* систему для вивчення гіпертрофічної відповіді. Клітинна лінія H9C2 отримана з ембріональної тканини шлуночків, що є надзвичайно важливим фактором, оскільки серцева гіпертрофія, спричинена артеріальною гіпертензією, переважно виникає у міокарді лівого шлуночка [24].

Слід відзначити, що H9C2 клітини здатні проявляти основні гіпертрофічні ознаки, спричинені гіпертрофічними стимулами *in vitro* [25]. У дослідженні групи вчених [24] було підтверджено, що неонатальні кардіоміоцити щурів імітують широкий спектр гіпертрофічних ознак і мають великі перспективи для аналізу функції кардіоміоцитів *in vitro*.

Вважається, що кардіальна гіпертрофія є адаптивним механізмом. У відповідь на механічні, гемодинамічні, гормональні та патологічні подразники серце пристосовується до підвищених потреб для серцевої діяльності шляхом збільшення м'язової маси через ініціювання гіпертрофічної реакції. Хоча гіпертрофічна відповідь спочатку є компенсаторним механізмом, стійка гіпертрофія може призвести до дилатаційної кардіоміопатії, СН і раптової смерті. Кінцевим наслідком кардіальної гіпертрофії є СН із дилатацією шлуночка та прогресуючим зниженням серцевого викиду, що призводить до вентрикулярної дисфункції та злоякісної аритмії. Гіпертрофія — фінальна молекулярна реакція кардіоміоцитів на різноманітні гіпертрофічні сигнали. Отже, кардіальна гіпертрофія є важливим фактором ризику СН [26].

На молекулярному рівні гіпертрофія кардіоміоцитів вважається результатом дисбалансу між прогіпертрофічними й антигіпертрофічними факторами та їх механізмами, що контролюють ріст клітин [26].

На клітинному рівні гіпертрофія кардіоміоцитів характеризується збільшенням розмірів клітин, посиленням синтезу білків і підвищеною організацією саркомеру [9].

Механізм виникнення кардіальної гіпертрофії при ЦД 2-го типу полягає у тому, що на тлі системної гіперінсулінемії, що є результатом ІР, посилюються ефекти інсуліну в клітинах, які не втрачають чутливості до гормону, зокрема у кардіоміоцитах. Отже, гіпертрофія є проявом мітогенної дії інсуліну [27].

Здатність метформіну пригнічувати синтез протеїнів у кардіоміоцитах, зменшувати серцеву масу та експресію прогіпертрофічних цитокінів свідчить

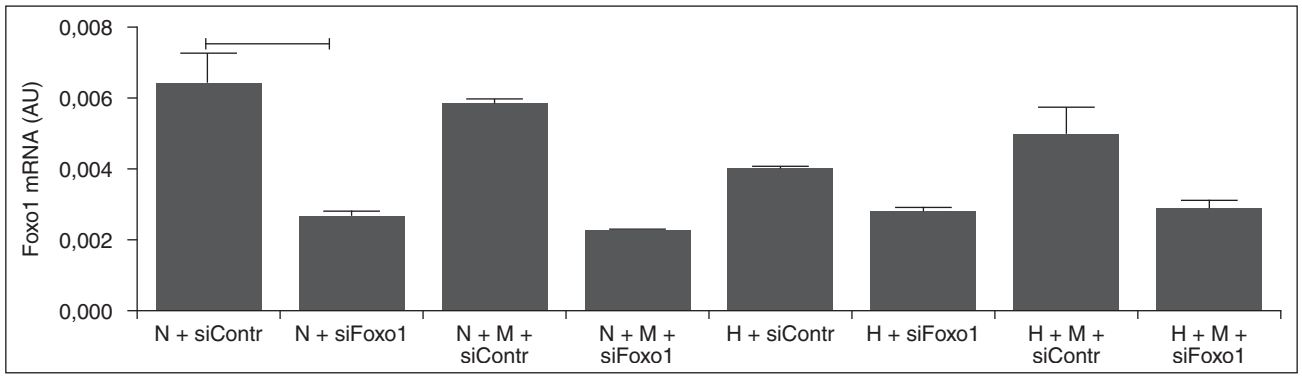

Рисунок 2. Рівні експресії гена Foxo1 після трансфекції H9C2 клітин із siRNA Control та siRNA Foxo1; H9C2 клітини трансфектовані за допомогою контрольної siRNA (siControl) або siRNA Foxo1 (siFoxo1). Рівень експресії Foxo1 визначений за допомогою qRT-PCR

про його терапевтичну ефективність при кардіальній гіпертрофії. Здатність метформіну зменшувати ізопротеренол-індуковану гіпертрофію кардіоміоцитів було підтверджено морфометрично. Крім того, метформін зменшував підвищену ізопротеренолом експресію профібротичних генів. Доведено, що метформін ефективно зменшує гіпертрофію, викликану підвищеним тиском [28].

У своєму дослідженні Evans et al. продемонстрували, що у пацієнтів із ЦД 2-го типу та СН, які приймали метформін або його комбінацію з препаратами сульфонілсечовини, спостерігався значно нижчий рівень смертності, порівняно з тими, хто отримував монотерапію препаратами сульфонілсечовини [29]. Інша група вчених (Aguilar et al.) підтвердила, що виживання пацієнтів, які отримували терапію метформіном, було істотно вищим [30]. Romero et al. [31] продемонстрували, що у пацієнтів із ЦД та СН лікування метформіном асоціюється з нижчими рівнями смертності та госпіталізації.

Дослідження UKPDS показало, що лікування метформіном, попри схожі з іншими цукрознижуючими засобами показники глікемічного контролю, асоціювалося зі зменшенням рівня загальної смертності та смерті від ЦД, а також із нижчим ризиком інфаркту міокарда [11]. У дослідженні SPREAD-DIMCAD встановлено, що пацієнти із ЦД 2-го типу та кардіоваскулярними захворюваннями, ліковані метформіном, мали на 46 % менший показник серцево-судинних ускладнень порівняно з тими, хто отримував гліпізид [32].

Наявні дані, що метформін може втручатися у ренін-ангіотензин-альдостеронову систему, індукуючи AMPK, внаслідок чого пригнічується синтез ангіотензину II [33]. При індукованій ангіотензином II гіпертрофії культивованих кардіоміоцитів метформін проявляв антигіпертрофічні властивості [34].

Відомо, що метформін чинить свої ефекти шляхом активації AMPK, яка інтенсивно експресується в печінці, кишечнику, скелетних м'язах, а також у міокарді [35].

Група дослідників Hu M. et al. [36] у своєму *in vitro* дослідженні виявила, що метформін у низькій дозі (5 mM) захищає H9C2 клітини (кардіоміоцити ембріонів щурів) від ушкодження, викликаного гіпоксією та гіперглікемією. Кардіопротективний ефект препарату *in vitro* був реалізований через AMPK/JNK-залежний механізм.

Проте доведено, що метформін чинить кардіопротективні ефекти також незалежно від AMPK [22].

В літературі описано, що метформін діє в ендотеліальних клітинах [37], печінці [38], ракових клітинах ендометрію шляхом регуляції активності транскрипційного білка forkhead box O1 (Foxo1), який кодується однойменним геном [39]. Встановлено також, що Foxo1 відіграє неабияку роль у підтримці кардіального гомеостазу [40].

У процесі експерименту нами було підтверджено, що метформін має виражені кардіопротективні властивості, зокрема, ефективно запобігає гіпертрофії H9C2 клітин. Наше дослідження також доводить, що експресія гена Foxo1 є критичним фактором у підтримці фізіологічних розмірів кардіоміоцитів.

Разом із тим на сьогодні нез'ясованим залишається питання, чи залучена експресія гена Foxo1 у механізмі антигіпертрофічної дії метформіну.

Висновки

В результаті проведених нами досліджень встановлено, що при нормальному функціонуванні гена Foxo1 метформін проявляє виражену антигіпертрофічну дію в умовах гіпоксії. Проте блокування експресії Foxo1 позбавляє препарат цього ефекту і викликає гіпертрофію H9C2 клітин в усіх умовах експерименту.

На нашу думку, виражена гіпертрофічна відповідь у групі клітин (H + M + siRNA Foxo1) може бути результатом одного з механізмів:

— метформін запобігає збільшенню розмірів клітин через Foxo1-залежний механізм, тому блокування гена Foxo1 призводить до втрати препаратом антигіпертрофічного ефекту;

— метформін захищає від гіпоксії незалежно від Foxo1-шляху, тому виражена гіпертрофія лікованих метформіном клітин, інкубованих у гіпоксії, є наслідком гальмування експресії Foxo1, що є потужним гіпертрофічним стимулом.

Отже, з'ясування кардіопротективного механізму дії метформіну є надзвичайно актуальним питанням і залишається остаточно не вивченим.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів при підготовці даної статті.

Джерело фінансування — програма Erasmus+.

Подяки. Дослідження проведене в лабораторії Інституту кардіоваскулярних і метаболічних захворювань (Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC — UMR1048)) в рамках угоди про співпрацю між ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України» та Paul Sabatier University, Toulouse, Франція. Висловлюємо подяку за допомогу у проведенні дослідження команді № 14 під керівництвом Dr. Oxana Kunduzova.

Інформація про внесок кожного автора: виконання досліджень, статистична обробка результатів — ***Лой Г.Я.***; аналіз результатів — ***Лой Г.Я.***, ***Олещук О.М.***, ***Корда М.М.***; актуальність — ***Пасєчко Н.В.***

References

1. World Health Organization. Global report on diabetes. 2016. Available from: http://www.who.int/diabetes/global-report/en/ .

2. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. World J Diabetes. 2015 Jun 25;6(6):850-67. doi: 10.4239/wjd.v6.i6.850.

3. Pappachan JM, Varughese GI, Sriraman R, Arunagirinathan G. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology, diagnostic evaluation and management. World J Diabetes. 2013 Oct 15;4(5):177-89. doi:

10.4239/wjd.v4.i5.177.

4. Dhalla NS, Rangi S, Zieroth S, Xu YJ. Alterations in sarcoplasmic reticulum and mitochondrial functions in diabetic cardiomyopathy. Exp Clin Cardiol. 2012 Sep;17(3):115-20.

5. Aneja A, Tang WW, Bansilal S, Garcia MJ, Farkouh ME. Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options. Am J Med. 2008 Sep;121(9):748-57. doi: 10.1016/j.amjmed.2008.03.046.

6. Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C–mediated caspase-3 activation pathway. Diabetes. 2002 Jun;51(6):1938-48.

7. Aragno M, Mastrocola R, Medana C, et al. Oxidative stress-dependent impairment of cardiac-specific transcription factors in experimental diabetes. Endocrinology. 2006 Dec;147(12):5967-74. doi: 10.1210/en.2006-0728.

8. Poornima IG, Parikh P, Shannon RP. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. Circ Res. 2006 Mar 17;98(5):596-605. doi: 10.1161/01.RES.0000207406.94146.c2.

9. Dorn GW 2nd, Robbins J, Sugden PH. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. Circ Res. 2003 Jun 13;92(11):1171-5. doi: 10.1161/01.RES.0000077012.11088.BC.

10. American Diabetes Association. 8, Pharmacologic approaches to glycemic treatment: standards of medical care in diabetes-2018. Diabetes Care. 2018 Jan;41(Suppl 1):S73-S85. doi: 10.2337/dc18-S008.

11. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. N Engl J Med. 2008 Oct 9;359(15):1577-89. doi: 10.1056/NEJMoa0806470.

12. Viollet B, Guigas B, Garcia NS, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. Clin Sci (Lond). 2012 Mar;122(6):253-70. doi: 10.1042/CS20110386.

13. Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi SI, Baxter RC. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. J Clin Endocrinol Metab. 2003 Mar;88(3):1323-32. doi: 10.1210/jc.2002-021394.

14. Maida A, Lamont BJ, Cao X, Drucker DJ. Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-α in mice. Diabetologia. 2011 Feb;54(2):339-49. doi: 10.1007/s00125-010-1937-z.

15. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. Diabetes. 2000 Dec;49(12):2063-9.

16. Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J Clin Invest. 2001 Oct;108(8):1167-74. doi: 10.1172/JCI13505.

17. Lage R, Diéguez C, Vidal-Puig A, López M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. Trends Mol Med. 2008 Dec;14(12):539-49. doi: 10.1016/j.molmed.2008.09.007.

18. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. Science. 2005 Dec 9;310(5754):1642-6. doi: 10.1126/science.1120781.

19. Zheng J, Woo SL, Hu X, et al. Metformin and metabolic diseases: a focus on hepatic aspects. Front Med. 2015 Jun;9(2):173-86. doi: 10.1007/s11684-015-0384-0.

20. Ouyang J, Parakhia RA, Ochs RS. Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase. J Biol Chem. 2011 Jan 7;286(1):1-11. doi: 10.1074/jbc.M110.121806.

21. Paiva MA, Gonçalves LM, Providência LA, Davidson SM, Yellon DM, Mocanu MM. Transitory activation of AMPK at reperfusion protects the ischaemic-reperfused rat myocardium against infarction. Cardiovasc Drugs Ther. 2010 Feb;24(1):25-32. doi: 10.1007/s10557-010-6222-3.

22. Xu X, Lu Z, Fassett J, et al. Metformin Protects Against Systolic Overload-Induced Heart Failure Independent of AMP-Activated Protein Kinase α2. Hypertension. 2014 Apr;63(4):723-8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02619.

23. Eijkelenboom A, Burgering BM. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 Feb;14(2):83-97. doi: 10.1038/nrm3507.

24. Watkins SJ, Borthwick GM, Arthur HM. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2011 Feb;47(2):125-31. doi: 10.1007/s11626-010-9368-1.

25. Koekemoer AL, Chong NW, Goodall AH, Samani NJ. Myocyte stress 1 plays an important role in cellular hypertrophy and protection against apoptosis. FEBS Lett. 2009 Sep 3;583(17):2964-7. doi: 10.1016/j.febslet.2009.08.011.

26. Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? Circulation. 2004 Apr 6;109(13):1580-9. doi: 10.1161/01.CIR.0000120390.68287.BB.

27. Iacobellis G, Ribaudo MC, Zappaterreno A, et al. Relationship of insulin sensitivity and left ventricular mass in uncomplicated obesity. Obes Res. 2003 Apr;11(4):518-24. doi: 10.1038/oby.2003.73.

28. Cha HN, Choi JH, Kim YW, Kim JY, Ahn MW, Park SY. Metformin inhibits isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in mice. Korean J Physiol Pharmacol. 2010 Dec;14(6):377-84. doi: 10.4196/kjpp.2010.14.6.377.

29. Evans JM, Doney AS, AlZadjali MA, et al. Effect of Metformin on mortality in patients with heart failure and type 2 diabetes mellitus. Am J Cardiol. 2010 Oct 1;106(7):1006-10. doi: 10.1016/j.amjcard.2010.05.031.

30. Aguilar D, Chan W, Bozkurt B, Ramasubbu K, Deswal A. Metformin use and mortality in ambulatory patients with diabetes and heart failure. Circ Heart Fail. 2011 Jan;4(1):53-8. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.952556.

31. Romero SP, Andrey JL, Garcia-Egido A, et al. Metformin therapy and prognosis of patients with heart failure and new-onset diabetes mellitus. A propensity-matched study in the community. Int J Cardiol. 2013 Jun 20;166(2):404-12. doi: 10.1016/j.ijcard.2011.10.141.

32. Hong J, Zhang Y, Lai S, et al. Effects of metformin versus glipizide on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. Diabetes Care. 2013 May;36(5):1304-11. doi: 10.2337/dc12-0719.

33. Lee JH, Kim JH, Kim JS, et al. AMP-activated protein kinase inhibits TGF-β-, angiotensin II-, aldosterone-, high glucose-, and albumin-induced epithelial-mesenchymal transition. Am J Physiol Renal Physiol. 2013 Mar 15;304(6):F686-97. doi: 10.1152/ajprenal.00148.2012.

34. Hernández JS, Barreto-Torres G, Kuznetsov AV, Khuchua Z, Javadov S. Crosstalk between AMPK activation and angiotensin II-induced hypertrophy in cardiomyocytes: the role of mitochondria. J Cell Mol Med. 2014 Apr;18(4):709-20. doi: 10.1111/jcmm.12220.

35. Nesti L, Natali A. Metformin effects on the heart and the cardiovascular system: a review of experimental and clinical data. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2017 Aug;27(8):657-669. doi: 10.1016/j.

numecd.2017.04.009.

36. Hu M, Ye P, Liao H, Chen M, Yang F. Metformin protects H9C2 cardiomyocytes from high-glucose and hypoxia/reoxygenation injury via inhibition of reactive oxygen species generation and inflammatory responses: role of AMPK and JNK. J Diabetes Res. 2016;2016:2961954. doi: 10.1155/2016/2961954.

37. Li X, Kover KL, Heruth DP, Watkins DJ, Moore WV, Jackson K, Zang M, Clements MA, Yan Y. New insight into metformin action: regulation of ChREBP and FOXO1 activities in endothelial cells. Mol Endocrinol. 2015 Aug;29(8):1184-94. doi: 10.1210/ME.2015-1090.

38. Kim YD, Park KG, Lee YS, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase–dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. Diabetes. 2008 Feb;57(2):306-14. doi: 10.2337/db07-0381.

39. Zou J, Hong L, Luo C, Li Z, et al. Metformin inhibits estrogen-dependent endometrial cancer cell growth by activating the AMPK–FOXO 1 signal pathway. Cancer Sci. 2016 Dec;107(12):1806-1817. doi: 10.1111/cas.13083.

40. KandulaV, KosuruR, LiH, et al. Forkhead box transcription factor 1: role in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. Cardiovasc Diabetol. 2016 Mar 8;15:44. doi: 10.1186/s12933-016-0361-1.

Отримано 25.09.2018

Пасечко Н.В., Лой Г.Я., Корда М.М., Олещук А.М.
ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет им. И.Я. Горбачевского», г. Тернополь, Украина

Роль экспрессии гена Foxo1 в механизме антигипертрофического действия метформина в кардиомиоцитах

Резюме. ***Актуальность.*** Диабетическая кардиомиопатия (ДКМ) является ведущей причиной смертности при сахарном диабете (СД) 2-го типа. Одним из основных патоморфологических признаков развития ДКМ считается гипертрофия кардиомиоцитов. Метформин, препарат выбора первой линии для лечения СД 2-го типа, кроме гипогликемических, вызывает кардиопротекторные эффекты. Однако механизм действия препарата в кардиомиоцитах изучен недостаточно. ***Цель.*** Изучение роли экспрессии гена Foxo1 в механизме антигипертрофического действия препарата метформин в кардиомиоцитах. ***Материалы и методы.*** H9C2 клетки были трансфектированы с помощью siRNA Foxo1 и siRNA negative control. Клетки были депривированы в 0% медиуме в течение 24 часов, за 30 минут до стресса пролечены метформином (5 mM) и помещены в гипоксический бокс на 16 часов с последующей реоксигенацией в течение четырех часов. Площади клеток определяли с помощью программы ImageJ. Эффективность трансфекции подтверждено с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. ***Результаты.*** При нормальном функционировании гена Foxo1 метформин оказывает выраженное антигипертрофическое действие в условиях гипоксии. Однако блокировка экспрессии гена Foxo1 лишает препарат этого эффекта и вызывает гипертрофию H9C2 клеток во всех условиях эксперимента. ***Выводы.*** Выраженная гипертрофическая реакция в группе клеток, трансфектированных с помощью siRNA Foxo1, которые культивировались в условиях гипоксии и были пролечены метформином, может быть результатом одного из механизмов: а) метформин предупреждает увеличение размеров клеток через Foxo1-зависимый механизм, поэтому блокировка гена Foxo1 приводит к потере препаратом антигипертрофического эффекта; б) метформин защищает от гипоксии независимо от Foxo1-пути, поэтому выраженная гипертрофия леченных метформином клеток, инкубированных в гипоксии, является следствием торможения экспрессии Foxo1, что является мощным гипертрофическим стимулом. Итак, изучение кардиопротекторного механизма действия метформина остается чрезвычайно актуальным вопросом и требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: диабетическая кардиомиопатия; гипертрофия; H9C2 клетки; метформин; Foxo1

N.V. Pasiechko, H.Ya. Loi, M.M. Korda, O.M. Oleshchuk
I. Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ternopil, Ukraine

Role of Foxo1 gene expression in mechanism of antihypertrophic action of metformin in cardiomyocytes

Abstract. ***Background.*** Diabetic cardiomyopathy is the leading cause of mortality in patients with type 2 diabetes mellitus. Hypertrophy of cardiomyocytes is one of the main pathomorphological signs of diabetic cardiomyopathy development. Metformin, the first-line drug for the treatment of type 2 diabetes mellitus, along with hypoglycaemic effects, exerts cardioprotective effects. However, the mechanism of metformin action in cardiomyocytes remains unclear. The purpose of the study was to investigate the role of Foxo1 gene expression in the mechanism of antihypertrophic action of metformin in cardiomyocytes. ***Materials and methods.*** H9C2 cells were transfected with siRNA Foxo1 and siRNA negative control. Cells were deprived in 0% medium for 24 hours, treated with metformin (5mM) 30 min before cell stress, then put into hypoxic chamber for 16 hours and reoxygenated for 4 hours. Cell area was quantified using ImageJ. Knockdown efficiency was confirmed by real time polymerase chain reaction. ***Results.*** At the normal functioning of Foxo1 gene, metformin has the expressed antihypertrophic action under hypoxia. However, blocking Foxo1 gene expression deprives preparation of this effect and causes the hypertrophy of H9C2 cells in all conditions of the experiment. ***Conclusions.*** The strong hypertrophic response in the group of H9C2 cells transfected with siRNA Foxo1 cultured under hypoxia with metformin treatment may be a result of following mechanisms: a) metformin prevents hypertrophy through Foxo1 pathway, thus, Foxo1 silencing totally blocked metformin protective effects on H9C2 hypertrophy; b) metformin protects against hypoxia independently of Foxo1 pathway, therefore, strong hypertrophy of metformin-treated cells incubated in hypoxia is the result of Foxo1 knockdown, a potent hypertrophic stimulus. Consequently, further investigations are still required to clarify the mechanisms by which metformin exerts its cardioprotective effects.

Keywords: diabetic cardiomyopathy; hypertrophy; H9C2 cells; metformin; Foxo1