

Роль АМФ-активируемой протеинкиназы в изменении устойчивости миокарда к ишемическому и реперфузионному повреждению под действием метформина при сахарном диабете тип 2

Е.Н. Кравчук, Е.Н. Гринева, М.М. Галагудза, А.А. Костарева, А.А. Байрамов
ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова»
Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург, Россия

Кравчук Е.Н. — научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории сосудистых осложнений сахарного диабета Института эндокринологии ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздравсоцразвития РФ (ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова); Гринева Е.Н. — доктор медицинских наук, руководитель Института эндокринологии ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова; Галагудза М.М. — доктор медицинских наук, руководитель Института экспериментальной медицины ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова, профессор кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» (СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова); Костарева А.А. — кандидат медицинских наук, руководитель Института молекулярной биологии и генетики ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова; Байрамов А.А. — доктор медицинских наук, заведующий научно-исследовательской лабораторией клинической эндокринологии с группой нейроэндокринологии Института эндокринологии ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова.

Контактная информация: Каменноостровский пр., д. 40А, кв. 90, Санкт-Петербург, Россия, 197022. Факс: 8 (812) 702–55–95. E-mail: kravchuke@gmail.com (Кравчук Екатерина Никодимовна).

Резюме

Актуальность. Единичные исследования свидетельствуют о том, что препарат из группы бигуанидов метформин в дополнение к хорошо известному сахароснижающему действию способен оказывать значимый кардиопротективный эффект. Молекулярные механизмы опосредованной метформином кардиопротекции практически не изучены. **Целью данного исследования** является изучение роли ключевого регулятора энергетического метаболизма клетки — АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК) — в изменении устойчивости миокарда к ишемическому и реперфузионному повреждению под действием метформина у животных с сахарным диабетом тип 2 (СД2). **Материалы и методы.** Исследование проводилось на крысах линии Wistar со стрептозотоцин-индуцированным неонатальным СД2. Для моделирования ишемии-реперфузии миокарда использовали изолированное, перфузируемое по Лангендорфу сердце с предварительным внутрибрюшинным введением метформина в течение 3 дней. Кардиопротективный эффект метформина оценивался по гемодинамическим показателям и по размеру инфаркта миокарда. Активность АМФК в миокарде оценивалась с помощью Вестерн-блоттинга. **Результаты.** Метформин не оказывал значимого эффекта на размер инфаркта и характер постишемического восстановления функции левого желудочка у здоровых животных и животных с СД2. В то же время размер инфаркта при СД2 был существенно ниже, чем в контрольной группе, что является подтверждением феномена метаболического прекондиционирования. Активация АМФК в миокарде по сравнению с контролем отмечалась как в группе животных с СД2, так и при введении метформина интактным и диабетическим животным. Введение метформина животным с СД2 сопровождалось максимальным увеличением активности АМФК. **Выводы.** Наличие СД2 приводило к активации АМФК и сопровождалось повышением толерантности миокарда к ишемии. При системном введении метформина до ишемии не отмечалось достоверного кардиопротективного эффекта, однако было зарегистрировано повышение активности АМФК в миокарде. Активность АМФК увеличивалась в наибольшей степени при сочетании СД2 и введения метформина.

Ключевые слова: сахарный диабет, миокард, АМФ-активируемая протеинкиназа, метформин.

The role of AMP-activated protein kinase in myocardial tolerance to ischemia and reperfusion injury in type 2 diabetes mellitus and its relation to metformin therapy

E.N. Kravchuk, E.N. Grineva, M.M. Galagoudza, A.A. Kostareva, A.A. Bairamov

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St Petersburg, Russia

Corresponding author: 40A-90 Kamennooostrovskiy av., St Petersburg, Russia, 197022. Fax: 8 (812) 702-55-95. E-mail: kravchuke@gmail.com (Ekaterina N. Kravchuk, MD, Researcher at the Department of the Cardiovascular Diabetic Complications at the Endocrinology Institute of Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre).

Abstract

Background. Several previous studies suggest that the drug in the biguanide class — metformin, in addition to the well-known hypoglycemic action can exert a significant cardioprotective effect. Molecular mechanisms of cardioprotection mediated by metformin are practically unknown. **Objective.** To examine the role of AMP-activated protein kinase (AMPK) — a key regulator of energy metabolism in myocardial tolerance to ischemia and reperfusion injury under the action of metformin in animals with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Design and methods.** The Wistar rats with streptozotocin-induced neonatal type 2 diabetes mellitus were used in the study. Ischemia-reperfusion of the myocardium was modeled according to Langendorf on the isolated heart with the preliminary intraperitoneal administration of metformin for 3 days. Cardioprotective effect of metformin was assessed by hemodynamic parameters and the size of myocardial infarction. AMPK activity in the myocardium was assessed by Western blot analysis. **Results.** Metformin did not significantly affected infarct size and nature of the postischemic recovery of left ventricular function in control group and in animals with T2DM. At the same time, the infarct size in T2DM was significantly lower than in the controls, which confirms the phenomenon of metabolic preconditioning. Activation of AMPK in the myocardium compared with the control group was observed in animals with T2DM, and in both metformin groups. Administration of metformin to animals with T2DM was accompanied by the maximum increase in AMPK activity. **Conclusions.** T2DM led to the activation of AMPK and was accompanied by improved myocardial tolerance to ischemia. In the absence of significant cardioprotective effect pre-ischemic systemic administration of metformin led to the increase of AMPK activity in the myocardium that was the highest in the animals with T2DM and metformin administration.

Key words: diabetes mellitus, myocardium, AMP-activated proteinkinase, metformin.

Статья поступила в редакцию: 22.06.12. и принята к печати: 10.07.12.

Введение

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является ведущей причиной летальности у пациентов с сахарным диабетом тип 2 (СД2) [1]. Хорошо известно о неблагоприятном клиническом течении и прогнозе сердечно-сосудистых заболеваний при СД. Выделяют специфическое осложнение СД — макроангиопатию, включающую в себя ИБС, а Американская кардиологическая ассоциация причислила СД к сердечно-сосудистым заболеваниям [2]. В этом случае речь идет в первую очередь о развитии выраженного, распространенного атеросклероза у больных СД.

При этом в ряде экспериментальных работ были получены данные о защитном эффекте СД при ишемическом повреждении миокарда, так называемом феномене метаболического preconditionирования

(МППреК), проявляющемся в парадоксальном повышении устойчивости миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению [3, 4].

Следует подчеркнуть, что, по-видимому, МППреК при СД в «чистом» виде существует только как экспериментальный феномен, воспроизводящийся у животных, генетически не предрасположенных к развитию атеросклероза. В клинической ситуации у пациентов с СД возможные кардиопротективные эффекты МППреК скорее всего нивелируются за счет сопутствующего выраженного атеросклеротического поражения коронарных артерий.

Весьма интересным является исследование возможных кардиопротективных свойств сахароснижающих препаратов. В настоящий момент нет единых стандартов ведения больных СД2 и ИБС, а имеющиеся рекомендации посвящены

препаратам, не влияющим на гликемический профиль.

По результатам исследований последних лет сахароснижающий препарат из группы бигуанидов метформин может обладать положительным влиянием на течение сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с СД. Было показано положительное влияние препарата на гемореологию [5, 6], липидный спектр крови [6, 7]. Кроме того, в некоторых экспериментальных работах доказано прямое противоишемическое действие препарата [8, 9]. В исследовании UKPDS было показано снижение общей смертности на 36 %, смертности, связанной с СД, инфарктом миокарда и инсультом, соответственно на 42, 39 и 41 % у больных СД2 с избыточной массой тела, получавших метформин в сравнении с пациентами, получавшими препараты сульфонилмочевины или инсулин при одинаковой степени компенсации углеводного обмена [10]. При этом однозначного мнения о механизмах действия метформина в настоящий момент нет.

В последнее время появляется все больше публикаций об АМФ-активируемой протеинкиназе (АМФК) как основной молекулярной мишени действия метформина. Эта внутриклеточная киназа является «энергетическим сенсором» клетки, запускаящим каскад энергосберегающих процессов и, таким образом, защищающим клетку от гибели [11]. Считается, что большинство положительных эффектов метформина опосредовано активацией АМФК [12].

Учитывая, что активация АМФК происходит в условиях энергодифицита, нельзя исключить, что активация этого фермента имеет место в кардиомиоцитах при СД. Известно, что поступление глюкозы в кардиомиоциты происходит за счет специфических переносчиков (GLUT), функция которых нарушена при СД2, что приводит к нехватке глюкозы — одного из энергетических субстратов кардиомиоцитов [13]. Основываясь на таком теоретическом предположении, представляется целесообразным изучить активность АМФК в миокарде при СД2 в условиях ишемии-реперфузии.

Целью настоящей работы явилось изучение роли АМФК в изменении устойчивости миокарда к ишемическому и реперфузионному повреждению под действием препарата класса бигуанидов метформина при наличии СД2.

Материалы и методы

Модель сахарного диабета тип 2. В данной работе использовали модель неонатального стреп-

тозотоцитозного СД, которая является экспериментальным аналогом СД2. СД2 был индуцирован однократной внутривентрикулярной инъекцией стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг, растворенного в цитратном буфере (pH 5,5), на 3–4-й день жизни крысам линии Wistar [14]. Перфузию изолированного сердца проводили через 10–12 недель после индукции СД2.

Перфузия изолированного сердца. Подробное описание модели ретроградной перфузии изолированного сердца по Лангендорфу приведено в другом источнике [15]. После 15-минутного периода стабилизации следовала 30-минутная глобальная ишемия с последующей 120-минутной реперфузией. В ходе эксперимента в изоволюмическом режиме регистрировали давление в левом желудочке. Программным методом получали значения следующих гемодинамических показателей: систолического, диастолического (ДДЛЖ), пульсового давления в левом желудочке (ПДЛЖ) и частоты сердечных сокращений (ЧСС). Обработка сигнала проводилась при помощи программного обеспечения PhysExp 2.0 [16]. Кроме того, регистрировалась скорость коронарного потока (КП) путем измерения объема раствора, оттекающего от сердца за единицу времени.

Протокол эксперимента включал 4 группы животных:

1. Контроль (К) (n = 13): здоровые крысы, получавшие инъекции 0,9 % раствора натрия хлорида в течение 3 дней перед проведением эксперимента.
2. Контроль + метформин (КМ) (n = 12): здоровые крысы, получавшие терапию метформином (Глюкофаж, Nycomed) в дозе 200 мг/кг внутривентрикулярно в течение 3 дней перед проведением эксперимента.
3. СД2 (n = 12): крысы с развившимся СД2, получавшие инъекции 0,9 % раствора натрия хлорида в течение 3 дней перед проведением эксперимента.
4. СД2 + метформин (СД2М) (n = 7): крысы с развившимся СД2, получавшие терапию метформином в дозе 200 мг/кг внутривентрикулярно в течение 3 дней перед проведением эксперимента.

Методика определения зоны инфаркта. Размер инфаркта определяли планиметрическим методом после 15-минутной инкубации срезов сердца в 1%-ом растворе трифенилтетразолия хлорида при 37°C.

Вестерн блоттинг. Измерение экспрессии активированной (фосфорилированной) формы АМФК было выполнено при использовании методики Вестерн блоттинга [17]. Образцы миокарда левого желудочка были измельчены в лизирующем буфере с добавлением ингибиторов протеиназ (Roche, Switzerland) и фосфатаз (ортованадат на-

трия, 10 mM) при помощи гомогенизатора. После центрифугирования была собрана надосадочная жидкость для дальнейшего использования. После измерения концентрации белка (Pierce Chemical Company, USA) был проведен электрофорез в полиакриламидном геле (12,5 %) с последующим переносом белков на нитроцеллюлозную мембрану. Далее производилось блокирование мембраны в растворе PBS tween 1 % с бычьим сывороточным альбумином (3 %) и инкубирование с первичными антителами к α -АМФК и фосфо- α -АМФК (Cell signaling) при 4°C в течение 12 часов. Затем была проведена реакция с вторичными антителами в течение 2 часов и детекция при помощи ECL-реагента (Amersham Biosciences, USA) и системы ChemiDoc XRS. Интенсивность экспрессии белка оценивали денситометрически; активность АМФК определяли по соотношению изоформ (фосфорилированной и нефосфорилированной); количество белка рассчитывали с поправкой на актин цитоскелета.

Статистическую достоверность различий оценивали с помощью программного пакета Statistica (ANOVA, тест Шеффе). Все функциональные данные выражались в виде «среднее $\pm$ стандартное отклонение». Различия расценивались как значимые при p менее чем 0,05.

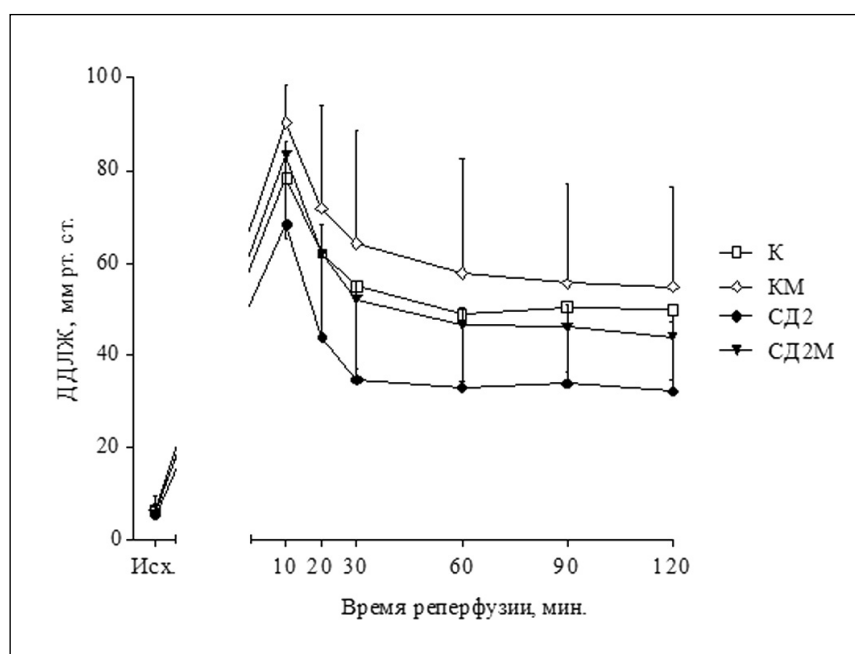
Результаты

Масса животных и уровень гликемии в экспериментальных группах. В контрольной группе масса животных на момент выполнения эксперимента составила 187 ± 32 г, а в группе с СД2 она была достоверно меньше и составляла 145 ± 13 г. Уровень гликемии в венозной крови перед выполнением перфузии изолированного сердца в группах контроля, КМ, СД2 и СД2М составил, соответственно, $6,0 \pm 0,6$; $6,4 \pm 0,6$; $9,5 \pm 3,3$ ($P < 0,05$ в сравнении с контролем) и $8,2 \pm 1,6$ ммоль/л. В группе СД2М на фоне введения метформина не произошло значимого снижения уровня гликемии, что, вероятно, связано с малой продолжительностью терапии.

Функциональное состояние сердца. При оценке таких гемодинамических показателей, как ДДЛЖ, ПДЛЖ и КП, достоверных отличий в исходном состоянии и в течение всего эксперимента выявлено не было. Динамика изменения ДДЛЖ в постишемическом периоде представлена на рисунке 1. В группах СД2 и СД2М наблюдалась статистически незначимая тенденция к уменьшению уровня ДДЛЖ в ходе реперфузии по сравнению с контрольной группой.

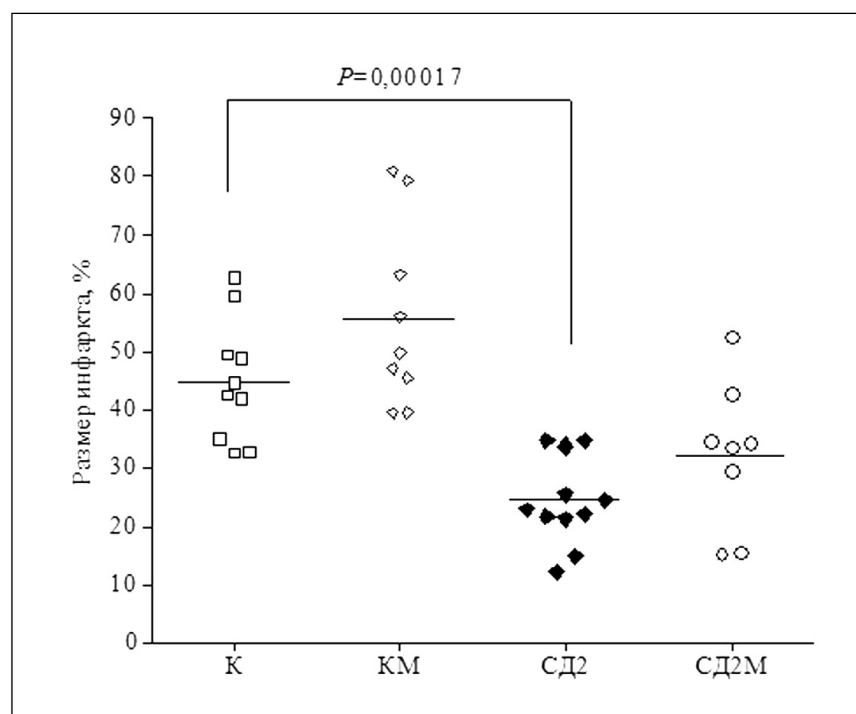
Размер зоны инфаркта. Данные по размеру инфаркта в различных группах приведены на рисунке 2. В контрольной группе размер инфаркта

Рисунок 1. Динамика изменения диастолического давления в левом желудочке



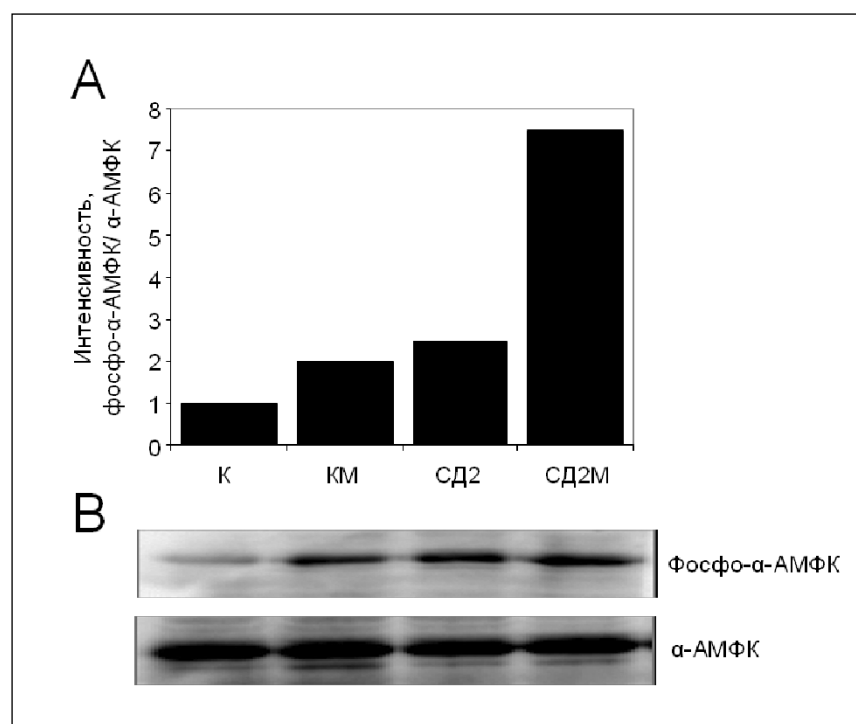
Примечание: К — группа контроля; КМ — группа контроля, получавшая терапию метформином; СД2 — группа животных с сахарным диабетом тип 2; СД2М — группа животных с сахарным диабетом тип 2, получавших терапию метформином; ДДЛЖ — диастолическое давление в левом желудочке.

Рисунок 2. Размер зоны инфаркта в экспериментальных группах



Примечание: К — группа контроля; КМ — группа контроля, получавшая терапию метформином; CD2 — группа животных с сахарным диабетом тип 2; CD2M — группа животных с сахарным диабетом тип 2, получавших терапию метформином. Размер инфаркта значительно меньше в группах CD2 и CD2M по сравнению с группами К и КМ.

Рисунок 3. Экспрессия α -АМФК и фосфо- α -АМФК. А. Денситометрическая оценка экспрессии фосфо- α -АМФК по отношению к α -АМФК. В. Результаты вестерн-блоттинга α -АМФК и фосфо- α -АМФК.



Примечание: АМФК — АМФ-активируемая протеинкиназа.

составил $45,0 \pm 10,4$ %. Введение метформина здоровым животным не приводило к уменьшению размера инфаркта ($55,6 \pm 15,8$ %). При этом у животных с верифицированным СД2 размер инфаркта был достоверно меньше, чем в контроле ($24,4 \pm 7,6$ %, $p = 0,00017$). Терапия метформином не приводила к заметному изменению размера инфаркта у животных с СД2 ($37,7 \pm 8,3$ %).

Экспрессия α -АМФК и фосфо- α -АМФК. Уровень экспрессии фосфо- α -АМФК в группах КМ, СД2, СД2М был значительно выше, чем в контрольной группе, а уровень α -АМФК не отличался во всех исследуемых группах. Данные представлены на рисунке 3. Эти данные позволяют судить об активации АМФК как при наличии СД2, так при терапии метформином, с суммацией эффекта при сочетании СД2 и метформина.

Обсуждение

Результаты данной работы свидетельствуют о том, что в использованных дозировке, пути введения и длительности терапии метформин не оказывал кардиопротективного эффекта как при экспериментальном СД2, так и при его отсутствии. При этом было выявлено парадоксальное повышение устойчивости миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению при СД2, характерное для МПрек. В более ранних исследованиях подобный эффект был доказан при СД1 [4].

В данном исследовании была доказана активация АМФК как под воздействием метформина, так и при наличии СД2. Во многих исследованиях была подтверждена активация АМФК под влиянием метформина [11, 18]. Возможно, данный фермент является ключевым в осуществлении основных эффектов метформина.

В физиологических условиях основным стимулом к активации АМФК является повышение соотношения АМФ/АТФ, что свидетельствует в первую очередь об энергетическом «голодании» клетки [19]. Таким образом, основными факторами для активации АМФК в клетке могут служить патологические стимулы — гипоксия, оксидативный стресс, осмотическое повреждение, недостаток глюкозы, а также физиологические — физические упражнения, мышечные сокращения и гормоны, включая лептин и адипонектин [20, 21]. Рассматриваются различные пути активации АМФК метформином. Один из предполагаемых вариантов — прямое повышение соотношения АМФ/АТФ под влиянием метформина [22]. Также показано, что метформин вызывает активацию фосфатидилинозитол-3ОН-киназы, функционально сопряженной с протеинкиназой В

(Akt) [8].

В случае же СД2 в миокарде развиваются метаболические изменения, связанные с нарушением доставки и утилизации глюкозы кардиомиоцитами [23]. Нарушение доставки глюкозы в кардиомиоциты происходит вследствие замедления транспорта глюкозы через сарколемму, что связано с уменьшением количества переносчиков глюкозы GLUT-1 и GLUT-4 [13]. Таким образом, энергетический метаболизм кардиомиоцитов, в норме на 20–40 % обеспечиваемый расщеплением глюкозы, практически полностью переходит на утилизацию жирных кислот [24]. Жирные кислоты, а также побочные продукты их утилизации, в частности цитрат, подавляют гликолиз [25]. Такая ситуация автоматически может приводить к повышению соотношения АМФ/АТФ. Таким образом, логично предположение об активации АМФК в кардиомиоцитах в условиях СД2, что было подтверждено в данном исследовании. Кроме того, АМФК можно рассматривать как один из факторов, играющих роль в реализации феномена метаболического прекондиционирования. Примечательно, что в различных экспериментальных исследованиях была подтверждена активация АМФК при ишемическом прекондиционировании. При этом роль АМФК в осуществлении защитного эффекта прекондиционирования не до конца понятна. Возможно, эффект реализуется через активацию АТФ-зависимых калиевых каналов [26, 27].

Отсутствие кардиопротективного эффекта при системном введении метформина до ишемии может быть связано с его недостаточным накоплением в миокарде [28].

Таким образом, в данной работе показано, что наличие СД2 приводило к активации АМФК и сопровождалось повышением толерантности миокарда к ишемии. При системном введении метформина до ишемии не отмечалось достоверного кардиопротективного эффекта, однако было зарегистрировано повышение активности АМФК в миокарде. Активность АМФК увеличивалась в наибольшей степени при сочетании СД2 и введения метформина.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2359.2012.7).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов.

Литература

1. Hurst R.T., Lee R.W. Increased incidence of coronary atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus: mechanisms and management // *Ann. Intern. Med.* — 2003. — Vol. 139, № 10. — P. 824–834.
2. Grundy S.M., Benjamin I.J., Burke G.L. et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association // *Circulation.* — 1999. — Vol. 100, № 10. — P. 1134–1146.
3. Kravchuk E., Grineva E., Bairamov A., Galagudza M., Vlasov T. The effect of metformin on the myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in the rat model of diabetes mellitus type II // *Exp. Diabetes Res.* — 2011. — Vol. 2011. — P. 907496. Epub 2011 Jun 22. — [Электронный ресурс]. — URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3132893/?tool=pubmed>
4. Galagudza M.M., Nekrasova M.K., Syrenskii A.V., Nifontov E.M. Resistance of the myocardium to ischemia and the efficacy of ischemic preconditioning in experimental diabetes mellitus // *Neurosci. Behav. Physiol.* — 2007. — Vol. 37, № 5. — P. 489–493.
5. Muller S., Denet S., Candiloros H. et al. Action of metformin on erythrocyte membrane fluidity in vitro and in vivo // *Eur. J. Pharmacol.* — 1997. — Vol. 337, № 1. — P. 103–110.
6. Nagi D.K., Yudkin J.S. Effects of metformin on insulin resistance, risk factors for cardiovascular disease, and plasminogen activator inhibitor in NIDDM subjects. A study of two ethnic groups // *Diabetes Care.* — 1993. — Vol. 16, № 4. — P. 621–629.
7. Wulffélé M.G., Kooy A., de Zeeuw D. et al. The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: a systematic review // *J. Intern. Med.* — 2004. — Vol. 256, № 1. — P. 1–14.
8. Bhamra G.S., Hausenloy D.J., Davidson S.M. et al. Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening // *Basic Res. Cardiol.* — 2008. — Vol. 103, № 3. — P. 274–284.
9. Calvert J.W., Gundewar S., Jha S. et al. Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling // *Diabetes.* — 2008. — Vol. 57, № 3. — P. 696–705.
10. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34) // *Lancet.* — 1998. — Vol. 352, № 9131. — P. 854–865.
11. Hardie D.G., Carling D., Carlson M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? // *Annu. Rev. Biochem.* — 1998. — Vol. 67. — P. 821–855.
12. Hawley S.A., Gadalla A.E., Olsen G.S., Hardie D.G. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism // *Diabetes.* — 2002. — Vol. 51, № 8. — P. 2420–2425.
13. Garvey W.T., Hardin D., Juhaszova M., Dominguez J.H. Effects of diabetes on myocardial glucose transport system in rats: implications for diabetic cardiomyopathy // *Am. J. Physiol.* — 1993. — Vol. 264, № 3. — P. 837–844.
14. Bagrov Y.Y., Manusova N.B., Egorova I.A. et al. Marinobufagenin, an Endogenous Inhibitor of α -1 Na/K-ATPase, Is a Novel Factor in Pathogenesis of Diabetes Mellitus // *Dokl. Biol. Sci.* — 2005. — Vol. 404. — P. 333–337.
15. Минасян С.М., Галагудза М.М., Сонин Д.Л. и др. Методика перфузии изолированного сердца крысы // *Рег. кров. и микроцирк.* — 2010. — Т. 8, № 4. — С. 54–59. / Minasian S.M., Galagudza M.M., Sonin D.L. et al. The technique of isolated rat heart perfusion // *Regional Blood Flow and Microcirculation [Regionalnoye Krovoobrascheniye i Mikroziirkulyaziya]*. — 2010. — Vol. 8, № 4. — P. 54–59 [Russian].
16. Королев Д.В., Александров И.В., Галагудза М.М., Сыренский А.В., Сонин Д.Л., Егорова Е.И. Автоматизация получения и обработки данных физиологического эксперимента // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* — 2008. — Т. 7, № 2 (26). — С. 79–84. / Korolev D.V., Alexandrov I.V., Galagudza M.M., Syrensky A.V., Sonin D.L., Egorova E.I. Automation of data acquisition and processing in physiological experiments // *Regional Blood Flow and Microcirculation [Regionalnoye Krovoobrascheniye i Mikroziirkulyaziya]*. — 2008. — Vol. 7, № 2. — P. 79–84 [Russian].
17. Ishihara T., Haraguchi G., Konishi M. et al. Effect of adiponectin on cardiac allograft vasculopathy // *Circ. J.* — 2011. — Vol. 75, № 8. — P. 2005–2012.
18. Kemp B. E., Stapleton D., Campbell D. J. et al. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator // *Biochem. Soc. Trans.* — 2003. — Vol. 31, № 1. — P. 162–168.
19. Hardie D.G., Scott J.W., Pan D.A., Hudson E.R. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system // *FEBS Lett.* — 2003. — Vol. 546, № 1. — P. 113–120.
20. Shaw R.J., Kosmatka M., Bardeesy N. et al. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* — 2004. — Vol. 101, № 10. — P. 3329–3335.
21. Winder W.W., Hardie D.G. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes // *Am. J. Physiol.* — 1999. — Vol. 277, № 1, Pt. 1. — P. 1–10.
22. Zhang L., He H., Balschi J.A. Metformin and phenformin activate AMP activated protein kinase in the heart by increasing cytosolic AMP concentration // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* — 2007. — Vol. 293, № 1. — P. 457–466.
23. Rodrigues B., Cam M.C., McNeill J.H. Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy // *Mol. Cell. Biochem.* — 1998. — Vol. 180, № 1–2. — P. 53–57.
24. Seymour A.M., Chatham J.C. The effects of hypertrophy and diabetes on cardiac pyruvate dehydrogenase activity // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 1997. — Vol. 29, № 10. — P. 2771–2778.
25. Schummer C.M., Werner U., Tennagels N. Dysregulated pyruvate dehydrogenase complex in Zucker diabetic fatty rats // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 2008. — Vol. 294, № 1. — P. 88–96.
26. Nishino Y., Miura T., Miki T. et al. Ischemic preconditioning activates AMPK in a PKC-dependent manner and induces GLUT4 up-regulation in the late phase of cardioprotection // *Cardiovasc. Res.* — 2004. — Vol. 61, № 3. — P. 610–619.
27. Sukhodub A., Jovanovic S., Du Q. et al. AMP-activated protein kinase mediates preconditioning in cardiomyocytes by regulating activity and trafficking of sarcolemmal ATP-sensitive K-channels // *J. Cell. Physiol.* — 2007. — Vol. 210, № 1. — P. 224–236.
28. Wilcock C., Bailey C.J. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse // *Xenobiotica.* — 1994. — Vol. 24, № 1. — P. 49–57.