

УДК 612.176.4

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА В МИОКАРДЕ КРЫСЫ ПРИ ПРОИЗВОЛЬНОЙ БЕГОВОЙ ТРЕНИРОВКЕ В КОЛЕСЕ: РОЛЬ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ

© 2020 г. А. А. Борzych^{a, *}, Е. К. Селиванова^b, А. А. Швецова^b, И. В. Кузьмин^b,
А. А. Мартьянов^b, А. М. Нестеренко^{c, d}, О. С. Тарасова^{a, b}

^aГосударственный научный центр Российской Федерации –
Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, 123007 Россия

^bМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, 119234 Россия

^cНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119992 Россия

^dИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 119997 Россия

*e-mail: borzykh.anna@gmail.com

Поступила в редакцию 17.04.2019 г.

После доработки 08.05.2019 г.

Принята к публикации 08.05.2019 г.

Тиреоидные гормоны повышают сократимость сердца, что связано с их влиянием на Ca^{2+} -гомеостаз кардиомиоцитов. Дейодиназа 2 типа (D2), обеспечивающая локальный синтез T_3 из T_4 , необходима для адаптации скелетных мышц к аэробной нагрузке, однако в миокарде ее роль не изучена. Целью работы было оценить влияние физической тренировки на уровни экспрессии генов, регулирующих сократительную функцию сердца, и изучить взаимосвязь содержания мРНК этих генов с показателями системной и локальной продукции T_3 . Самцов крыс Вистар содержали в клетках с беговыми колесами в течение 8 недель, затем от них получали образцы сыворотки крови (для определения гормонов методом ИФА) и мышечной ткани (для определения содержания мРНК методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией). Тренировка сопровождалась умеренной гипертрофией камбаловидной мышцы и повышением содержания в ней мРНК цитратсинтазы. Масса желудочков сердца и уровни экспрессии мРНК α МНС и β МНС, β_1 -адренорецепторов, Cav1.2, Serca2, RyR2 и PLB не различались у тренированной и контрольной групп крыс. Содержание свободного T_3 в крови крыс и экспрессия мРНК D2 в миокарде левого желудочка увеличивались в результате тренировки, при этом между этими показателями была выявлена отрицательная корреляция. У тренированных, но не контрольных крыс наблюдались положительные корреляции содержания мРНК Serca2, Cav1.2 и RyR2 с содержанием мРНК D2, но не с уровнем свободного T_3 в крови. Наличие таких корреляций предполагает, что адаптивные изменения миокарда при физической тренировке обусловлены влиянием локально синтезируемого T_3 , а не повышением его системной продукции.

Ключевые слова: кальциевый гомеостаз, кардиомиоциты, дейодиназа 2, тиреоидные гормоны, физическая тренировка

DOI: 10.31857/S0233475520010041

ВВЕДЕНИЕ

Гормоны щитовидной железы – тироксин (T_4) и трийодтиронин (T_3) – играют важную роль в регуляции многих функций организма, в том числе работы сердечно-сосудистой системы. Хорошо известно, что тиреоидные гормоны повышают сократимость миокарда и что этот эффект обусловлен влиянием этих гормонов на сократительный аппарат кардиомиоцитов и механизмы, от-

ветственные за регуляцию цитоплазматической концентрации Ca^{2+} [1]. Тиреоидные гормоны увеличивают экспрессию гена сердечной изоформы миозина α МНС, которая обладает более высокой АТФ-азной активностью, и снижают экспрессию гена β МНС. Они повышают экспрессию гена риадиновых рецепторов (RyR2), которые формируют Ca^{2+} -каналы саркоплазматического ретикула, и гена Ca^{2+} -зависимой АТФ-азы (Serca2),

которая обеспечивает закачку Ca^{2+} в депо и ускорение расслабления кардиомиоцитов [2–4]. Кроме того, T_3 потенцирует инотропные эффекты катехоламинов путем стимуляции экспрессии β_1 -адренорецепторов (β_1 -AR) [2, 5, 6].

Долговременные эффекты тиреоидных гормонов в кардиомиоцитах опосредованы ядерными рецепторами и связаны с изменением транскрипции генов с гормон-чувствительными последовательностями в промоторном регионе [7]. T_3 по сравнению с T_4 более активен, поскольку обладает более высоким сродством к ядерным рецепторам, в том числе к рецептору $\text{TR}\alpha_1$, ключевой мишени тиреоидных гормонов в кардиомиоцитах [4, 8]. Локальный синтез T_3 из T_4 в кардиомиоцитах обеспечивает дейодиназа 2 типа (D2) [4, 9], в связи с этим этот фермент является важным участником тиреоидной регуляции сердца.

Физическая тренировка в аэробном режиме нагрузки повышает выносливость скелетных мышц и оказывает благоприятное влияние на работу сердца [10–12], что, среди прочих механизмов, может быть связано с влиянием тиреоидных гормонов. С одной стороны, физическая нагрузка изменяет работу гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси, продукцию гормонов щитовидной железой и их потребление тканями [13–15]. С другой стороны, локальный синтез T_3 с участием D2 является необходимым условием адаптивного повышения экспрессии генов в работающих скелетных мышцах [16], однако в сердце такая регуляторная роль D2 пока не изучена. Таким образом, вопрос об источниках T_3 и его роли в изменении транскриптома кардиомиоцитов при аэробной нагрузке пока остается открытым.

Целью нашей работы было оценить влияние физической тренировки на уровни экспрессии генов, регулирующих сократительную функцию сердца, и изучить взаимосвязь содержания мРНК этих генов с показателями системной и локальной продукции T_3 : содержанием T_3 в крови и экспрессией D2 в миокарде, соответственно.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Исследования проводили на самцах крыс Вистар по протоколу, одобренному комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН. Животных содержали в помещении вивария с контролируемой температурой и световым циклом 12/12 ч (включение освещения – 9^{00} , выключение – 21^{00}). Воду и корм для грызунов (ООО “Лабораторкорм”, Москва) крысы получали *ad libitum*.

Физическая тренировка крыс. Тренировку крыс проводили в режиме произвольного бега с использованием разработанного нами аппаратно-

программного комплекса [17]. В возрасте 5 недель крыс попарно помещали в клетки стандарта ТЗ с беговым колесом для адаптации к экспериментальным условиям. Через неделю крыс рассаживали индивидуально в клетки без бегового колеса (группа “Контроль”) или в клетки с постоянным доступом к колесу (группа “Тренировка”). На ободе колеса диаметрально друг относительно друга были установлены два магнита для детекции каждого полуоборота колеса. Для непрерывной регистрации и анализа показателей беговой активности крыс использовали оригинальное программное обеспечение. Длительность тренировочного цикла составила 8 недель.

Анализ содержания гормонов в крови. Для определения содержания тиреоидных гормонов у крыс из надреза кончика хвоста под местной анестезией брали пробы смешанной крови (500 мкл). Из образцов крови получали сыворотку и замораживали ее при -20°C [17, 18]. Определение содержания общего T_4 и свободного T_3 в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа с использованием наборов ЗАО “НВО Иммунотех” (Россия).

Получение образцов мышечной ткани. Взятие тканей проводили строго в одно и то же время суток (с 9.00 до 9.30 утра). За 20 ч до получения образцов мышечной ткани беговые колеса были удалены из экспериментальных установок для исключения острого (краткосрочного) влияния физической нагрузки на экспрессию генов. Крыс наркотизировали CO_2 и декапитировали гильотиной, затем выделяли и взвешивали желудочки сердца (правый отдельно, левый с перегородкой) и камбаловидную мышцу. Образцы ткани левого желудочка и камбаловидной мышцы замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до проведения исследований экспрессии генов.

Исследование уровня экспрессии генов (количественная ПЦР с обратной транскрипцией). Экстракцию тотальной РНК из образцов мышечной ткани проводили с помощью набора Clean RNA Standard (Евроген, Россия) по протоколу производителя с некоторыми модификациями. Концентрацию нуклеиновых кислот в полученных образцах измеряли с помощью спектрофотометра (NanoDrop 2000, The Thermo Scientific, США). Полученные образцы РНК были обработаны ДНКазой I (Fermentas, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) проводили обратную транскрипцию с тотальной РНК (200 нг) с использованием набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия) и праймеров со случайными последовательностями нуклеотидов длиной 6 п.н. согласно прилагаемой инструкции. Синтезированную кДНК хранили при -70°C до проведения количественной ПЦР.

Таблица 1. Последовательности праймеров и размеры продуктов ПЦР

Ген	Белок	Последовательность праймеров (5'-3')	Размер ампликона, п.н.
<i>Gapdh</i>	GAPDH	Прямой: CCATCAAGGACCCCTTCATT Обратный: CACCAGCATCACCCCATTT	157
<i>Actb</i>	β -Актин	Прямой: CAGGGTGTGATGGTGGGTATGG Обратный: AGTTGGTGACAATGCCGTGTTC	115
<i>Ppia</i>	Циклофилин	Прямой: TGGATGGCAAGCATGTGGTCTTTG Обратный: CTTCTTGCTGGTCTTGCCATT CCT	101
<i>Cs</i>	Цитратсинтаза	Прямой: GТАCTATGGCATGACGGAGATG Обратный: TCCGTGCTCATGGACTTG	134
<i>Myh6</i>	α МНС	Прямой: ACAGAGTGCTTCGTGCCTGAT Обратный: CGAATTTTCGGAGGGTTCTGC	151
<i>Myh7</i>	β МНС	Прямой: СТАССААСССТААГГАТGCCT Обратный: TTGTGTTTCTGCCTAAGGTGC	75
<i>Dio2</i>	D2	Прямой: CTTTGAACGTGTGTGCATCGT Обратный: TCTCCAGCCAACCTTCGGACTT	100
<i>Thra</i>	THR α 1	Прямой: GCCCTTACTCACCCCTACA Обратный: TAAGCCAAGCCAAGCTGTCCT	133
<i>Adrb1</i>	β_1 -AR	Прямой: CATCATGGGTGTGTTACGCTCTG Обратный: GCGTAGCCAGCCAGTTGAAGAA	120
<i>Cacna1c</i>	Cav 1.2	Прямой: CATCTCCATCACCTTCTTCC Обратный: AAATACCTGCATCCCAATCAC	181
<i>Atp2a2</i>	Serca2	Прямой: CGAGTTGAACCTTCCCACAA Обратный: AGGAGATGAGGTAGCGGATGAA	268
<i>Ryr2</i>	RyR2	Прямой: GAGAGCCCCGGAAGCTCTGAA Обратный: GGCAACTCCATGGCACACAC	132
<i>Pln</i>	PLB	Прямой: ААСТАААСAGTCTGCATTGTGACGA Обратный: GCCGAGCGAGTAAGGTATTGGA	178

Примечание: D2 – дейодиназа 2 типа, β_1 -AR – β_1 -адренорецепторы, RyR2 – рианодиновые рецепторы типа 2, PLB – фосфоламбан, п.н. – пары нуклеотидов.

Праймеры для проведения ПЦР были синтезированы в ЗАО Евроген (Россия). Последовательности прямых и обратных праймеров для целевых и референсных генов приведены в табл. 1. ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Программа амплификации включала начальную денатурацию при 95°C (10 мин), 40 циклов ПЦР (30 с при 95°C, 30 с при 60°C и 60 с при 72°C) и заключительную инкубацию при 72°C (10 мин).

Определение количества мРНК исследуемых генов относительно мРНК референсных генов (среднее геометрическое по трем генам – GAPDH, β -актин и циклофилин) было выполнено методом $\Delta\Delta Ct$. Содержание мРНК каждого из генов в образце мышечной ткани тренированных крыс выражали в процентах относительно среднего содержания соответствующей мРНК у контрольных крыс.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрических кри-

териев Манна–Уитни и Вилкоксона. Для корреляционного анализа данных вычисляли непараметрический коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Данные в тексте, в таблицах и на рисунках приведены в виде медианы и межквартильного размаха, n – объем выборки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В течение тренировочного цикла крысы проявляли беговую активность в темное время суток. За 8 недель тренировки суммарный пробег составил 142.7 (93.5; 261.8) км, суммарное время бега – 76.2 (60.3; 119.3) ч, а средняя скорость в интервалах бега – 29.6 (24.5; 34.3) м/мин. Масса тела крыс к концу эксперимента значительно увеличилась, но не различалась между группами. Вместе с тем относительная масса камбаловидной мышцы у тренированных крыс была увеличена по сравнению с контролем (табл. 2). Уровень экспрессии мРНК цитратсинтазы в этой мышце у бегающих

Таблица 2. Морфометрические показатели и содержание тиреоидных гормонов в сыворотке крови контрольных и тренированных крыс

	Контроль (n = 7)	Тренировка (n = 9)
<i>Масса тела, г</i>		
В начале эксперимента	99.0 (90.0; 111.0)	90.0 (80.0; 125.3)
В конце эксперимента	351.0 (320.0; 385.0) [#]	357.5 (339.0; 398.5) [#]
<i>Относительная масса органов, мг/100 г массы тела</i>		
Камбаловидная мышца	35.8 (34.2; 40.6)	43.0 (40.8; 44.8)*
Правый желудочек	53.1 (48.5; 53.8)	54.3 (51.5; 57.2)
Левый желудочек	231.3 (225.1; 242.4)	243.6 (222.8; 253.4)
<i>Содержание тиреоидных гормонов в сыворотке крови</i>		
Общий T ₄ , нмоль/л	78.3 (77.6; 88.5)	87.1 (81.8; 92.5)
Свободный T ₃ , пмоль/л	4.3 (2.9; 5.6)	6.2 (4.5; 7.6)*

Примечание: * $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой (критерий Манна–Уитни), [#] $p < 0.05$ по сравнению со значением в начале эксперимента (критерий Вилкоксона).

крыс был вдвое выше, чем в контрольной группе: 205.8 (178.5; 243.5)% и 100.0 (75.6; 146.5)%, соответственно ($p < 0.05$).

Относительная масса желудочков сердца у тренированных и контрольных животных не различалась (табл. 2). Также не выявлено межгрупповых различий в уровне экспрессии сердечных изоформ миозина (α МНС и β МНС) (рис. 1).

Содержание общего T₄ в крови (показатель секреторной активности щитовидной железы) в результате тренировки не изменилось, но содержание свободного T₃ (активная форма гормона) заметно увеличилось в результате тренировки (табл. 2). Уровни экспрессии мРНК TR α_1 у двух групп крыс не различались (рис. 1). Однако у тренированных крыс наблюдалось двукратное повышение экспрессии мРНК D2 по сравнению с кон-

тролем (рис. 1). При этом в группе “Тренировка” была выявлена отрицательная корреляция между уровнем T₃ в крови и экспрессией мРНК D2 в миокарде (рис. 2a). В группе “Контроль” такой зависимости не наблюдалось, по всей видимости, в связи с низкой вариабельностью у контрольных крыс как уровня T₃, так и экспрессии D2 (рис. 2a).

В нашей работе не было обнаружено статистически значимых изменений содержания мРНК β_1 -AR, Cav 1.2, Serca2, RyR2 и PLB в миокарде тренированных крыс, однако у большинства животных уровни экспрессии Cav 1.2, Serca2 и RyR2 превышали средний уровень в контроле (рис. 1). В связи с этим представлялось интересным исследовать взаимосвязи содержания мРНК этих генов и D2 в миокарде. В группе “Тренировка” были выявлены положительные корреляции содержания мРНК D2 и Serca2 (рис. 2б), D2 и

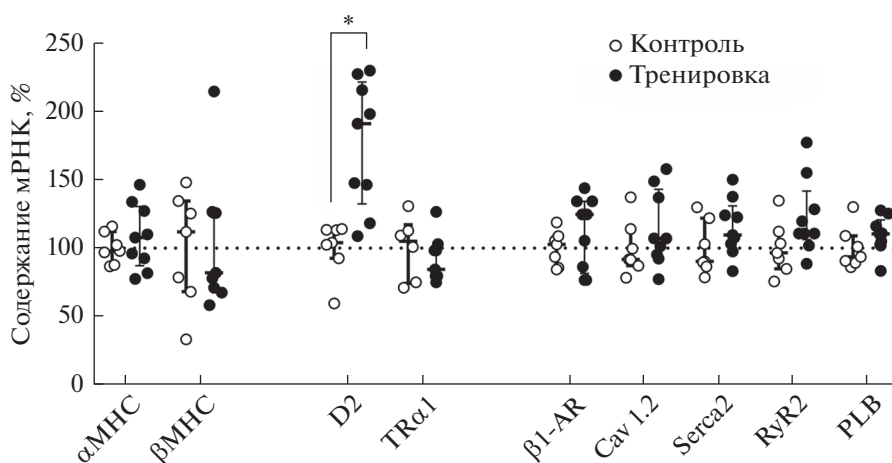


Рис. 1. Относительные уровни экспрессии генов в миокарде левого желудочка у контрольных (n = 7) и тренированных (n = 9) крыс. За 100% принято среднее значение содержания мРНК данного гена в контрольной группе. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем (критерий Манна–Уитни).

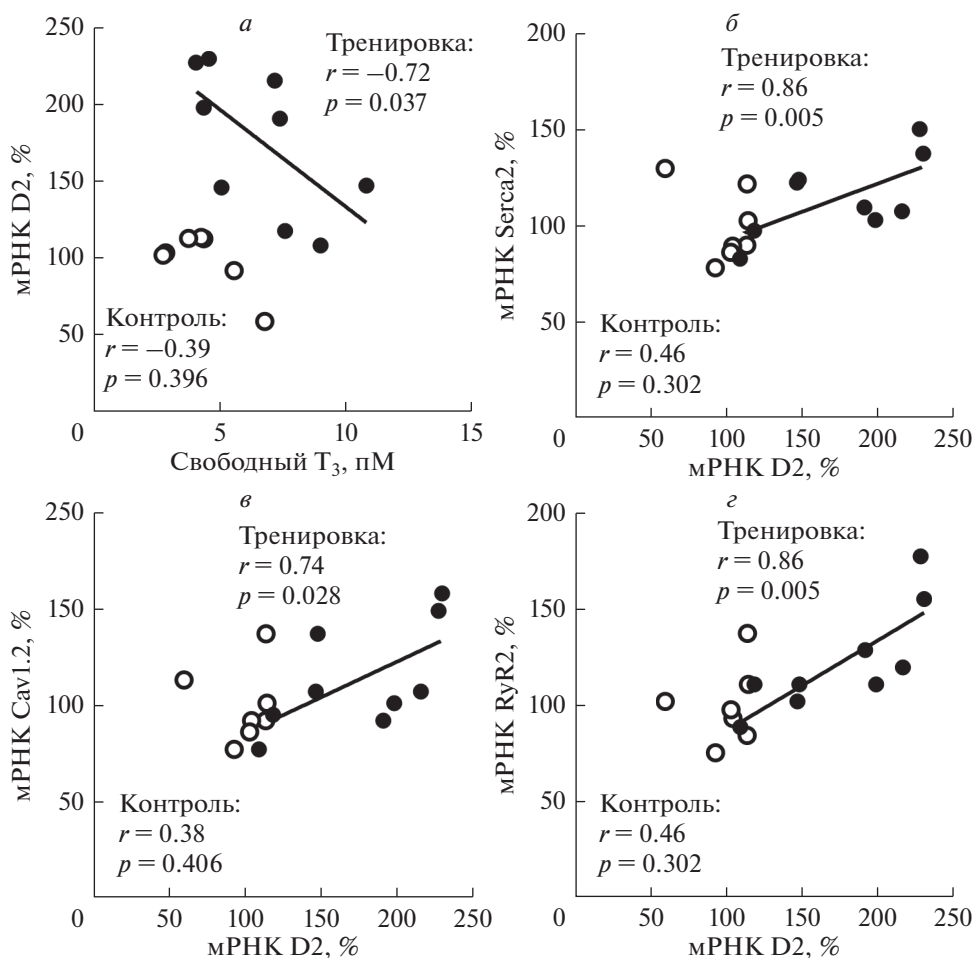


Рис. 2. Взаимосвязь показателей тиреоидного статуса и генной экспрессии в группах “Контроль” (белые кружки, $n = 7$) и “Тренировка” (черные кружки, $n = 9$). *a* – Корреляция содержания свободного T_3 в крови и мРНК дейодиназы 2 (D2) в миокарде. *б, в, з* – Корреляция содержания мРНК D2 и мРНК Ca^{2+} -зависимой АТФ-азы (Serca2, *б*), мРНК α_1 субъединицы потенциал-управляемых кальциевых каналов L-типа (Cav 1.2, *в*) и мРНК рианодинных рецепторов 2 типа (RyR2, *з*). r – Коэффициент корреляции Спирмена, p – уровень статистической значимости.

Cav 1.2 (рис. 2в), а также D2 и RyR2 (рис. 2з). В контрольной группе ни для одного из перечисленных выше генов не было выявлено статистически значимой корреляции с экспрессией гена D2, что также может объясняться низкой внутригрупповой вариабельностью показателей.

Следует также отметить, что ни в одной из экспериментальных групп не было выявлено корреляции между содержанием мРНК генов-регуляторов кальциевого гомеостаза кардиомиоцитов и содержанием свободного T_3 в крови. Коэффициенты корреляции с уровнем свободного T_3 для содержания мРНК RyR2, Cav 1.2 и Serca2 составили -0.45 ($p = 0.230$), -0.48 ($p = 0.188$) и -0.54 ($p = 0.127$) соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате произвольной беговой тренировки у крыс выявлены изменения тиреоидной регу-

ляции как на системном, так и на локальном уровне: повышение содержания T_3 в крови и уровня экспрессии мРНК D2 в миокарде левого желудочка, соответственно. При этом у тренированных, но не контрольных крыс содержание мРНК трех генов-регуляторов кальциевого гомеостаза кардиомиоцитов положительно коррелировало с миокардиальным уровнем экспрессии D2, но не с системным уровнем T_3 .

Прежде всего следует отметить, что в результате использованной нами методики тренировки (произвольный бег в колесе) у крыс наблюдалась умеренная гипертрофия локомоторной (камбаловидной) мышцы и повышение в ней экспрессии мРНК цитратсинтазы. В нашей предыдущей работе, где применялась аналогичная методика тренировки крыс, в локомоторной мышце было выявлено выраженное повышение белков ОХРНOS, принадлежащих к различным комплексам дыхательной цепи митохондрий [19].

Сходные результаты описаны и другими авторами [20, 21]. В совокупности эти данные говорят об эффективном влиянии произвольной беговой тренировки на окислительный потенциал локомоторных мышц.

В нашей работе после произвольной беговой тренировки у крыс наблюдалось увеличение содержания T_3 в крови. Предыдущие работы говорят, что влияние физической тренировки на состояние гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси зависит от параметров и субъективной переносимости нагрузки. Так, в экспериментах на крысах интенсивная тренировка на беговой дорожке может сопровождаться снижением содержания в крови тиреотропного гормона, T_4 и T_3 [22], тогда как тренировка в бесстрессовых условиях (произвольный бег в колесе) не вызывает таких изменений [14].

Следует отметить, что повышение свободного T_3 в крови крыс наблюдалось на фоне неизменного уровня T_4 , который отражает общую секреторную активность щитовидной железы. Такое соотношение уровней двух форм тиреоидных гормонов может быть связано с влиянием физической тренировки на экспрессию и активность дейодиназы первого типа (D1). D1 локализована в щитовидной железе, печени и почках и является основным источником циркулирующего в крови T_3 , в отличие от D2, которая синтезирует T_3 преимущественно для собственных нужд клетки [9, 23]. Вторым объяснением может служить изменение содержания или же некоторое превышение буферной емкости белков-переносчиков тиреоидных гормонов в крови тренированных крыс при повышении содержания T_3 . К сожалению, на основании измерения только двух форм тиреоидных гормонов мы не можем сказать, какое из приведенных выше объяснений верное. Отметим, что повышение циркулирующего T_3 в крови было недостаточным для ингибирования тиреоидной оси по механизму отрицательной обратной связи.

Повышение содержания свободного T_3 в крови является предпосылкой для его влияния на экспрессию генов в миокарде. Среди многочисленных мишеней T_3 в кардиомиоцитах наиболее интересными для нас были ген D2, а также гены-регуляторы обмена Ca^{2+} в кардиомиоцитах. Известно, что тиреоидные гормоны подавляют экспрессию гена D2 [24]. В связи с этим вполне закономерна выявленная нами в группе тренированных крыс отрицательная корреляция между системным уровнем свободного T_3 и содержанием мРНК D2 в миокарде. В контрольной группе крыс вариабельность этих показателей сравнительно невелика, тогда как тренировка приводит к возникновению их значительных индивидуальных различий. Однако, несмотря на негативное

влияние T_3 , уровень экспрессии D2 в миокарде после тренировки все же увеличен по сравнению с контролем. Очевидно, что межгрупповые различия в экспрессии D2, возникающие в результате тренировки, обусловлены влиянием не циркулирующего в крови T_3 , а иными, но также связанными с физической активностью механизмами. Ранее было показано, что уровень экспрессии D2 в бурой жировой ткани повышается при симпатической стимуляции [5, 6], а повышение экспрессии D2 в скелетных мышцах при беговой нагрузке устраняется блокадой β -адренорецепторов [16]. Как известно, физическая нагрузка связана с повышением активности симпатической нервной системы [25], которое может служить стимулом к увеличению экспрессии D2 в миокарде. Следует отметить, что, согласно общепринятой точке зрения, активность D2 преимущественно определяется ее содержанием в клетках [23].

Мы не обнаружили статистически значимых изменений экспрессии мРНК генов-регуляторов кальциевого гомеостаза в сердце тренированных крыс. Следует отметить, что влияние физической тренировки на экспрессию этих генов в миокарде исследовано мало, и нам удалось найти лишь одну работу по этому вопросу [26]. Авторы этой работы также не обнаружили изменения содержания мРНК β_1 -AR, Cav 1.2, Serca2, RyR2 и PLB в левом желудочке самок крыс при беговой тренировке в колесе в течение 7 недель. Возможно, интенсивность нагрузки при произвольной беговой тренировке недостаточно высока для выраженного потенцирования экспрессии этих генов.

Вместе с тем хорошо известно, что увеличение сократимости сердечной мышцы под действием T_3 связано с повышением экспрессии генов RyR2 и Serca2 [2–4]. Нами выявлены положительные корреляции экспрессии мРНК D2 и генов RyR2, Cav1.2, Serca2 в группе тренированных крыс. Наличие таких корреляций предполагает, что увеличение экспрессии D2 вследствие тренировки приводит к локальному повышению продукции T_3 в кардиомиоцитах и, следовательно, росту экспрессии генов, регулирующих их кальциевый гомеостаз.

В контрольной группе крыс содержание мРНК RyR2, Cav 1.2 и Serca2 не коррелирует с экспрессией D2: индивидуальные различия этих показателей у нетренированных крыс невелики, что, среди прочих причин, может быть обусловлено влиянием отрицательной связи между внутриклеточным уровнем T_3 и экспрессией D2 (сдвиг одного из показателей может компенсироваться за счет противоположного изменения другого). У тренированных крыс повышение активности симпатoadrenalовой системы стимулирует экспрессию D2, что приводит к локальному увеличению продукции T_3 , активации тиреоидного сиг-

налинга и росту экспрессии генов RyR2, Cav 1.2 и Serca2.

Следует отметить, что мы проводили анализ экспрессии генов Serca2 и RyR2 с учетом всех возможных транскрипт-вариантов (трех вариантов для Serca2 и двух — для RyR2). Показано, что различные транскрипт-варианты Serca2 экспрессируются с одного промотора, в котором имеются тироид-чувствительные элементы [27]. В связи с этим именно суммарное повышение экспрессии транскрипт-вариантов должно отражать влияние T₃ на экспрессию гена Serca2, что было принципиальным для решения нашей задачи. Для гена RyR2 показана четкая связь снижения суммарной экспрессии его транскрипт-вариантов с развитием сердечной недостаточности у крыс [28]. Вместе с тем результаты нашей работы не позволяют однозначно судить о влиянии физической тренировки на механизмы кальциевого гомеостаза кардиомиоцитов, для ответа на этот вопрос нужны дальнейшие исследования.

Таким образом, в данной работе впервые показано, что адаптивное изменение экспрессии генов-регуляторов кальциевого гомеостаза в миокарде при физической тренировке связано с повышением экспрессии D2 и, следовательно, локального синтеза T₃. Маловероятно, что оно обусловлено действием циркулирующего T₃: отрицательная корреляция концентрации T₃ в крови с содержанием мРНК D2 предполагает скорее снижение, а не повышение экспрессии Serca2, Cav 1.2 и RyR2 в кардиомиоцитах, что противоречит многочисленным данным литературы [1–4]. Мы полагаем, что влияние произвольной тренировки на обмен ионов кальция в кардиомиоцитах обусловлено действием не циркулирующего, а локально синтезируемого в кардиомиоцитах T₃. В связи с этим физическая нагрузка умеренной интенсивности может быть использована для профилактики снижения и коррекции сократимости сердечной мышцы при заболеваниях различной природы, включая гипотиреоидные состояния.

Работа выполнена по плану фундаментальных исследований ГНЦ РФ — ИМБП РАН. Исследования экспрессии генов проведены при поддержке РФФИ (грант № 19-015-00482).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Klein I., Ojamaa K. 2001. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.* **344** (7), 501–509.
- Danzi S., Klein I. 2012. Thyroid Hormone and the Cardiovascular System. *Med. Clin. North Am.* **96**, 257–268.
- Mullur R., Liu Y.-Y., Brent G.A. 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* **94**, 355–382.
- Yen P. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. 2001. *Physiol. Rev.* **81** (3), 1097–1143.
- Silva J.E., Bianco S.D.C. 2008. Thyroid-adrenergic interactions: Physiological and clinical implications. *Thyroid.* **18**, 157–165.
- Silva J.E., Larsen P.R. 1983. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature.* **305**, 712–713.
- Vella K.R., Hollenberg A.N. 2017. The actions of thyroid hormone signaling in the nucleus. *Mol. Cell. Endocrinol.* **458**, 127–135.
- Brent G.A. 2012. Mechanisms of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.* **122**, 3035–3043.
- Kelly G.S. 2000. Peripheral metabolism of thyroid hormones: A review. *Altern. Med. Rev.* **5** (4), 306–333.
- Besnier F., Labrunée M., Pathak A., Pavy-Le Traon A., Galès C., Sénard J.M., Guiraud T. 2017. Exercise training-induced modification in autonomic nervous system: An update for cardiac patients. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* **60** (1), 27–35.
- Padilla J., Simmons G.H., Bender S.B., Arce-Esquivel A.A., Whyte J.J., Laughlin M.H. 2011. Vascular effects of exercise: Endothelial adaptations beyond active muscle beds. *Physiology (Bethesda).* **26** (3), 132–145.
- Pósa A., Szabó R., Kupai K., Baráth Z., Szalai Z., Csonka A., Veszéka M., Gyöngyösi M., Radák Z., Ménesi R., Pávó I., Berkó A.M., Varga C. 2015. Cardioprotective effects of voluntary exercise in a rat model: Role of matrix metalloproteinase-2. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 876805.
- Bernert V., Wartofsky L. 2000. Thyroid function and exercise. In: *Sports endocrinology*. Eds. Warren M., Constantini N. New York: Humana Press Inc., p. 97–118.
- Katzeff H.L., Bovbjerg D., Mark D.A. 1988. Exercise regulation of triiodothyronine metabolism. *Am. J. Physiol.* **255** (6 Pt. 1), E824–E828.
- O'Connell M., Robbins D.C., Horton E.S., Sims E.A., Danforth E. Jr. 1979. Changes in serum concentrations of 3,3',5'-triiodothyronine and 3,5,3'-triiodothyronine during prolonged moderate exercise. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **49** (2), 242–246.
- Bocco B.M., Louzada R.A., Silvestre D.H., Santos M.C., Anne-Palmer E., Rangel I.F., Abdalla S., Ferreira A.C., Ribeiro M.O., Gereben B., Carvalho D.P., Bianco A.C., Werneck-de-Castro J.P. 2016. Thyroid hormone activation by type 2 deiodinase mediates exercise-induced peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α expression in skeletal muscle. *J. Physiol.* **594** (18), 5255–5269.
- Борзых А.А., Кузьмин И.В., Нестеренко А.М., Селиванова Е.К., Мартыанов А.А., Николаев Г.М., Мамонов П.А., Шарова А.П., Тарасова О.С. 2017. Динамика показателей произвольного бега крыс в колесах в течение восьми недель тренировки. *Авиакосмическая и экологическая медицина.* **51** (3), 66–73.
- Sofronova S.I., Gaynullina D.K., Shvetsova A.A., Borzykh A.A., Selivanova E.K., Kostyunina D.S., Sharova A.P., Martyanov A.A., Tarasova O.S. 2017. Antenatal/early postnatal hypothyroidism alters arterial

- tone regulation in 2-week-old rats. *J. Endocrinol.* **235** (2), 137–151.
19. Gaynullina D.K., Borzykh A.A., Sofronova S.I., Selivanova E.K., Shvetsova A.A., Martyanov A.A., Kuzmin I.V., Tarasova O.S. 2018. Voluntary exercise training restores anticontractile effect of NO in coronary arteries of adult rats with antenatal/early postnatal hypothyroidism. *Nitric Oxide.* **74**, 10–18.
 20. Henriksen E.J., Halseth A.E. 1995. Adaptive responses of GLUT-4 and citrate synthase in fast-twitch muscle of voluntary running rats. *Am. J. Physiol.* **268** (1 Pt 2), R130–R134.
 21. Chicco A.J., Schneider C.M., Hayward R. 2005. Voluntary exercise protects against acute doxorubicin cardiotoxicity in the isolated perfused rat heart. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289** (2), R424–R431.
 22. Wahrmann J.P., Fulla Y., Rieu M., Kahn A., Dinh-Xuan A.T. 2002. Altered myosin isoform expression in rat skeletal muscles induced by a changed thyroid state. *Acta Physiol. Scand.* **176** (3), 233–243.
 23. Gereben B., Zavacki A.M., Ribich S., Kim B.W., Huang S.A., Simonides W.S., Zeöld A., Bianco A.C. 2008. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr. Rev.* **29** (7), 898–938.
 24. Bianco A.C., Salvatore D., Gereben B., Berry M.J., Larsen P.R. 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* **23** (1), 38–89.
 25. Michelini L.C., O'Leary D.S., Raven P.B., Nóbrega A.C. 2015. Neural control of circulation and exercise: A translational approach disclosing interactions between central command, arterial baroreflex, and muscle metaboreflex. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **309** (3), H381–H392.
 26. Stones R., Natali A., Billeter R., Harrison S., White E. 2008. Voluntary exercise-induced changes in beta2-adrenoceptor signalling in rat ventricular myocytes. *Exp. Physiol.* **93** (9), 1065–1075.
 27. Hartong R., Wang N., Kurokawa R., Lazar M.A., Glass C.K., Apriletti J.W., Dillmann W.H. 1994. Delineation of three different thyroid hormone-response elements in promoter of rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase gene. Demonstration that retinoid X receptor binds 5' to thyroid hormone receptor in response element 1. *J. Biol. Chem.* **269** (17), 13021–13029.
 28. Qiu Z., Zhang W., Fan F., Li H., Wu C., Ye Y., Du Q., Li Z., Hu X., Zhao G., Sun A., Bao Z., Ge J. 2012. Rosuvastatin-attenuated heart failure in aged spontaneously hypertensive rats via PKC α / β 2 signal pathway. *J. Cell. Mol. Med.* **16** (12), 3052–3061.

Changes in the Expression of Genes Regulating Calcium Homeostasis in Rat Myocardium Induced by Voluntary Wheel Training: The Role of Thyroid Hormones

A. A. Borzykh^{1,*}, E. K. Selivanova², A. A. Shvetsova², I. V. Kuzmin²,
A. A. Martyanov², A. M. Nesterenko^{3,4}, O. S. Tarasova^{1,2}

¹Institute for Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123007 Russia

²Faculty of Biology, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119234 Russia

³Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119992 Russia

⁴Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: borzykh.anna@gmail.com

Thyroid hormones increase cardiac contractility due to their effect on the cardiomyocyte Ca²⁺ homeostasis. Deiodinase type 2 (D2), which provides local synthesis of T₃ from T₄, is essential for the adaptation of skeletal muscles to aerobic exercise, but in the myocardium its role has not been explored. The aim of the work was to assess the effect of wheel training on the expression of genes regulating the heart contractility and to study the relationship of their mRNA content in the myocardium with indicators of systemic and local T₃ production. Male Wistar rats were housed in cages with running wheels for 8 weeks, then serum and muscle tissue samples were obtained to determine hormones and mRNA content by ELISA and quantitative PCR, respectively. The training was accompanied by a moderate hypertrophy of the soleus muscle and an increase in its citrate synthase mRNA content. Ventricle mass and the expression levels of α MHC, β MHC, β ₁-adrenoreceptors, Cav1.2, Serca2, RyR2, and PLB mRNA were not altered as compared with control. Serum content of free T₃ and the content of D2 mRNA in the left ventricle increased as a result of training; a negative correlation was found between these indicators. In trained but not in control rats, the levels of Serca2, Cav1.2, and RyR2 mRNA positively correlated with the D2 mRNA content; however, these parameters did not correlate with the blood free T₃ level. The observed correlations suggest that myocardium adaptation to aerobic exercise is governed by the influence of locally synthesized T₃ rather than by an increase in its systemic production.

Keywords: calcium homeostasis, cardiomyocytes, deiodinase 2, thyroid hormones, wheel training