

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О.  
БОГОМОЛЬЦЯ

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

Меженський Олег Русланович

УДК 612.73:576.323.2:611.018.74

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**Вивчення ролі PPAR-гамма в регуляції ендотелійзалежних реакцій аорти щура  
в нормі та при діабеті 2 типу**

*091 «Біологія»*

*09 «Біологія»*

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і  
текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

---

Науковий керівник: **І.Б.Філіпов**  
кандидат біологічних наук, старший  
дослідник

**Київ — 2024**

## Анотація

*Меженський О.Р.* Вивчення ролі PPAR- $\gamma$  в регуляції ендотелійзалежних реакцій аорти щура в нормі та при діабеті 2 типу. — Кваліфікаційна праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія» — Інститут Фізіології ім. О.О. Богомольця НАНУ, Київ, 2024.

Дисертація присвячена дослідженню ендотелійзалежного розслаблення грудної аорти щура, впливом PPAR- $\gamma$  на цей процес, змінам компонентів ендотелійзалежного розслаблення в моделі діабету 2 типу, неспецифічним ефектам лігандів PPAR- $\gamma$  та просторовим відмінностям у ендотелійзалежних реакціях між проксимальною та дистальною частинами аорти щура.

У ході дослідження використовувалися наступні методи: тензометрія, докінг, РНК-секвенування, експериментальна модель діабету 2 типу.

Уперше був показаний методом аналізу даних РНК секвенування градієнт диференційної експресії та функціональний градієнт для калієвих каналів вхідного випрямлення, потенціалзалежних кальцієвих каналів L типу, тубуліну та елементів м'язового комплексу між проксимальною та дистальною частиною грудної аорти, що поглиблює розуміння особливостей функціонування аорти та дозволяє краще контролювати варіацію в експериментальних даних у дослідженнях судинної системи.

Було визначено внески ендотелійзалежного гіперполяризуючого фактору (EDHF), нітроген II оксиду (NO), TRPV4-каналу, простаноїдів та неадренаргічне нелохінергічне ендотелійзалежне розслаблення сегментів аорти щура в нормі. Також було показано, співвідношення внесків кальцій-залежних калієвих каналів проміжної та малої провідності, у TRPV4 ендотелійзалежне розслаблення.

Було показано, що дія агоніста PPAR- $\gamma$  — росіглітазону не впливала на EDHF, а була пов'язана зі збільшенням внесків NO, простаноїдів, TRPV4-каналів у

ендотелійзалежне розслаблення. Окрім того, уперше було визначено, що ефект росіглітазону, найімовірніше, пов'язаний із прямим впливом на розчину цитоплазматичну гуанілатциклазу, що, може, пояснити ефекти лігандів PPAR-γ на серцево-судину систему.

Дослідження внесків компонентів ендотелійзалежного розслаблення в експериментальній моделі діабету 2 типу в щурів показали, що внесок EDHF суттєво знижується, а внесок NO та простаноїдів зростають. Уперше було показано, що в діабеті 2 типу TRPV4-залежне розслаблення підсилюється і збільшується внесок кальційзалежних калієвих каналів малої провідності в це розслаблення. Також, росіглітазон у нормі й за умов діабету 2 типу посилював ефекти NO, простаноїдів та TRPV4-каналів у ендотелійзалежне розслаблення сегментів грудної аорти щурів.

Методом молекулярного докінгу була вперше показана здатність росіглітазону неспецифічно зв'язуватися з двопородоменими калієвими каналами TWIK та TRAAK мембрани ГМК аорти, а також із розчинною гуанілатциклазою.

**Ключові слова:** *серцево-судина система, аорта, ендотелій, розслаблення, ацетилхолін, щур, NO, PPAR, KIR, йонні канали, ГМК, докінг, EDHF, експресія, TRPV.*

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у фахових наукових виданнях України

1. **Mezhenskyi OR**, Philyppov IB. Evaluation of the component's contribution in endothelium-dependent acetylcholine-induced relaxation of the rat aorta. *Fiziol Zhurnal* 70: 26–34, 2024. doi: 10.15407/FZ70.02.026. *(Особистий внесок здобувача — проведення експериментальної роботи, аналіз даних, написання тексту статті)*

### Статті в зарубіжних виданнях

2. **Mezhenskyi OR**, Philyppov IB. The difference in endothelium-dependent relaxation components in proximal and distal thoracic aorta regions of male rats. *Physiol Rep* 12: e15992, 2024. doi: 10.14814/PHY2.15992. *(Особистий внесок здобувача — проведення експериментальної роботи, проведення біоінформатичного аналізу даних, написання тексту статті) (Квартиль 2 / Q2)*

## Матеріали та тези доповідей конференцій, з'їздів

3. **Меженський О.Р.,** Філіппов І.Б., Шуба Я.М. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СКЛАДОВИХ ЕНДОТЕЛІЙЗАЛЕЖНОГО АЦЕТИЛХОЛІНОВОГО РОЗСЛАБЛЕННЯ ГРУДНОЇ АОРТИ ЩУРА. ІХ з'їзд Українського біофізичного товариства. 2023 Київ 70–71. *(Особистий внесок здобувача — проведення експериментальної роботи, аналіз даних, написання тексту тез)*
4. **Меженський О. Р.,** Філіппов І. Б. QUANTITATIVE DEFINITION OF COMPONENT'S ROLE IN ENDOTHELIUM-DEPENDENT ACETYLCHOLINE-INDUCED RELAXATION OF RAT AORTA. ІХ міжнародна науково-практична конференція MODERN PROBLEMS OF SCIENCE EDUCATION AND SOCIETY (Київ 2023), 87–88. *(Особистий внесок здобувача — проведення експериментальної роботи, аналіз даних, написання тексту тез)*
5. **Меженський О.Р.,** Філіппов І.Б.,. Компоненти ендотеліязалежного ацетилхолінового розслаблення грудної аорти щура в діабеті 2 типу. ХХІ Міжнародна науково конференція «ШЕВЧЕНКІВСЬКА ВЕСНА: ДОСЯГНЕННЯ В НАУКАХ ПРО ЖИТТЯ/ADVANCEMENTS IN LIFE SCIENCES» (Київ 2024). *(Особистий внесок здобувача — проведення експериментальної роботи, аналіз даних, написання тексту тез)*
6. **Mezhenskyi O. R.,** Philyppov I. B. IMPACT OF ROSIGLITAZONE ON COMPONENTS OF ENDOTHELIUM-DEPENDENT ACETYLCHOLINE-INDUCED RELAXATION OF RAT AORTA. ІV міжнародна науково-практична конференція PERSPECTIVES OF CONTEMPORARY SCIENCE: THEORY AND PRACTICE (Львів 2024), 59–60. *(Особистий внесок здобувача — проведення експериментальної роботи, аналіз даних, написання тексту тез)*
7. **Меженський О.Р,** Філіппов І.Б. Ефект росіглітазону на компоненти ендотеліязалежного розслаблення аорти щура в нормі та діабеті 2 типу. Науково-практичній конференції ХХІІІ читання ім.В.В. Підвисоцького (Одеса 2024). *(Особистий внесок*

*здобувача — проведення експериментальної роботи, аналіз даних, написання тексту тез)*

## Summary

**Mezhenskyi O.R. Role of PPAR-gamma in regulation of endothelium-dependent reactions of rat aorta in norm and in type 2 diabetes.** Manuscript.

The PhD thesis in the field of knowledge 09 «Biology» by specialty 091 «Biology». — Bogomoletz institute of physiology, NASU, Kyiv, 2024.

The thesis is dedicated to the study of endothelium-dependent relaxation of thoracic rat aorta, how PPAR regulates this process, how components of endothelium-dependent relaxation change under type 2 diabetes, to non-specific effects of PPAR ligands, and to spatial differences in endothelium-dependent reactions in proximal and distal regions of rat aorta.

During the study, the next methods were used: tensitometry, molecular docking, RNA-sequencing, and experimental model of type 2 diabetes.

In this study, we have been the first who show differential expression gradient and functional gradient for potassium inward rectifying channels, L-type calcium channels, tubulin, and muscular complex elements between proximal and distal parts of the thoracic aorta. It facilitates our understanding of intricate regulations of rat aorta and allows researchers to better control variation in experimental data regarding aorta reactions in their studies.

Investment of endothelium-dependent hyperpolarizing factor (EDHF), nitric oxide (NO), TRPV4 channel, prostanoids, and nonadrenergic noncholinergic neuromediators in endothelium-dependent relaxation in norm was shown. Also, we have shown the ratio of investment of calcium-dependent potassium channels' small and intermediate conductance in TRPV4-dependent relaxation.

It was shown that agonist PPAR- $\gamma$  — rosiglitazone effects are connected to impact on NO, prostanoids, and TRPV4 increasing their impact, but not on EDHF. In addition, it was shown for the first time that the rosiglitazone effect is connected to the direct impact on

soluble guanylate cyclase, which can explain the observed effects of PPAR ligands on the cardiovascular system, which was shown in previous studies.

A study of endothelium-dependent relaxation components contributions in diabetes showed that EDHF contribution significantly decreased, and the contribution of NO and prostanoids increased. Also, we have shown that TRPV4-dependent relaxation is amplified in type 2 diabetes and the contribution of calcium-dependent potassium channels' small conductance increases. The application of rosiglitazone in diabetes, the same as in control, amplifies the effects of NO, prostanoids, and TRPV4.

Using molecular docking we was the first who have shown abilities of rosiglitazone to non-specifically binding to two pore domain potassium channels TWIK and TRAAK, and also with soluble guanylat cyclase, what may be used in next pharmacological studies.

**Keywords:** cardio-vascular system, aorta, endothelium, relaxation, acetylcholine, rat, NO, PPAR, ion channels, intracellular enzymes, SMC, type 2 diabetes, EDHF, differential expression, TRPV.



Анотація .....	2
<b>1 Вступ .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Актуальність .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 Мета та завдання роботи.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Новизна.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Практична значимість результатів .....</b>	<b>17</b>
<b>1.5 Особистий внесок .....</b>	<b>18</b>
<b>1.6 Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.....</b>	<b>18</b>
<b>1.7 Апробація результатів роботи.....</b>	<b>19</b>
<b>1.8 Публікації.....</b>	<b>19</b>
<b>1.9 Структура та обсяг роботи .....</b>	<b>19</b>
Список умовних скорочень .....	20
<b>2 Огляд літератури.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Особливості анатомії та функціонування аорти .....</b>	<b>22</b>
2.1.1 Ендотелій.....	24
2.1.2 Гладеньком'язові клітини .....	26
2.1.3 Інші типи клітин.....	27
<b>2.2 Регуляція тонузу судинної стінки аорти.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3 Роль TRP каналів у регуляції судинного тонузу .....</b>	<b>30</b>
<b>2.4 Роль PPAR-γ рецепторів у регуляції тонузу судинної стінки.....</b>	<b>33</b>
<b>2.5 Зміни в регуляції тонузу судинної стінки спричинені діабетом .....</b>	<b>45</b>
<b>3 Матеріали та методи.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Тваринні експерименти.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2 Тензометрія.....</b>	<b>50</b>
<b>3.3 Моделювання діабету 2 типу за допомогою Нікотинамід/Стрептозоточин моделі .....</b>	<b>52</b>
<b>3.4 Біоінформатичний аналіз даних РНК секвенування.....</b>	<b>54</b>
3.4.1 Аналіз головних компонент .....	56
3.4.2 Аналіз диференційної експресії генів у різних ділянках аорти .....	58
<b>3.5 Метод молекулярного докінгу .....</b>	<b>63</b>
<b>3.6 Статистичний аналіз .....</b>	<b>68</b>
<b>4 Результати та обговорення .....</b>	<b>70</b>

<b>4.1</b>	<b>Диференційна експресія кальцієвих каналів вхідного випрямлення, кальцієвих каналів, генів м'язового комплексу та ацетилхолінових рецепторів у грудній або черевній аорті.....</b>	<b>70</b>
4.1.1	Результати аналіз РНК-секвенування.....	73
4.1.2	Використання методу тензометрії для визначення відмінностей у функціонуванні різних ділянок аорти. ....	75
<b>4.2</b>	<b>Внески компонентів ацетилхолін-індукованого розслаблення в нормі.....</b>	<b>81</b>
4.2.1	Роль KIP-каналів в ацетилхолін-індукованому розслабленні.....	82
4.2.2	Відносний внесок міоендотеліальних контактів і мембран гладеньком'язових клітин у поширення ендотелій-залежного гіперполяризуючого фактору.....	84
4.2.3	Внесок оксиду азоту та KIR-каналів у ацетилхолін-індуковане розслаблення аорти .....	85
4.2.4	Внесок TRPV4-каналів в ацетилхолін-індукованому розслабленні.....	87
4.2.5	Внесок IK/SK каналів у TRPV4 залежне розслаблення .....	90
4.2.6	Роль простагландинів в ацетилхолін-індукованому розслабленні.....	91
4.2.7	Внесок сенсорної іннервації в ацетилхолін-індуковане розслаблення аорти.....	93
<b>4.3</b>	<b>Вплив росіглітазону на компоненти ацетилхолін-індукованого розслаблення.....</b>	<b>96</b>
4.3.1	Ефект росіглітазону на KIR-залежну компоненту ацетилхолінового розслаблення .....	98
4.3.2	Ефект росіглітазону на NO-залежну компоненту ацетилхолінового розслаблення.....	99
4.3.3	Дія росіглітазону на ЦОГ-залежну компоненту ацетилхолінового розслаблення.....	102
4.3.4	Вплив росіглітазону на потенціалзалежні кальцієві канали L-типу мембрани гладеньком'язових клітин .....	103
<b>4.4</b>	<b>Моделювання неспецифічного зв'язування лігандів PPAR-γ та TRPV4 з йонними каналами та сигнальними молекулами, що регулюють судинні функції методом молекулярного докінгу.....</b>	<b>104</b>
<b>4.5</b>	<b>Внески компонентів у ацетилхолін-індуковане розслаблення при діабеті 2 типу.....</b>	<b>109</b>
4.5.1	Амплітуда ацетилхолін-індукованого розслаблення препаратів аорти при діабеті 2 типу ... ..	110
4.5.2	Внесок NO в ацетилхолін-індуковане розслаблення в діабеті 2 типу та ефект росіглітазону на цей внесок.....	111
4.5.3	Внесок KIR в ацетилхолін-індуковане розслаблення в діабеті 2 типу та ефект росіглітазону на цей внесок .....	113
4.5.4	Внесок ЦОГ-½, в ацетилхолін-індуковане розслаблення при діабеті 2 типу.....	114
4.5.5	Визначення амплітуд TRPV4-залежного розслаблення в діабетичних щурів.....	115
<b>5</b>	<b>Аналіз та узагальнення отриманих результатів .....</b>	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
5.1	Внески компонентів у ацетилхолінове розслаблення .....	118
5.2	Вплив росіглітазону на ацетилхолінове розслаблення та його компоненти .....	120
5.3	Внески компонентів ацетилхолінового розслаблення при діабеті 2 типу та ефект росіглітазону на них.....	122

5.4	Неспецифічна активація йонних каналів/сигнальних молекул росіглітазоном .....	125
5.5	Диференційна експресія генів компонентів ацетилхолінового розслаблення між проксимальною та дистальною частиною грудної аорти.....	126
6	Висновки .....	128
7	Список використаної літератури .....	131

# 1 Вступ

## 1.1 Актуальність

Аорта є головною артерією кровоносної системи хребетних, що, виходить, із лівого шлуночка серця, постачає артеріальною (збагаченою киснем) кров'ю всі тканини й органи тіла. Аорта за своєю будовою складна трубка, яка анатомічно розділена на грудну та черевну частини, та включає в себе три окремі шари: tunica intima, tunica media, adventitia. Tunica intima вистилає просвіт аорти і складається з одного шару ендотеліальних клітин, які прикріплені до базальної мембрани. Ендотеліальні клітини відповідають за наробку сигнальних молекул, які контролюють тонус судин і виробляють ферменти, важливі для імунної функції, згортання крові та адгезії тромбоцитів. Tunica media переважно складається з гладеньком'язових клітини (ГМК), які відіграють важливу роль у динамічній реакції на зміну тиску в аорті за рахунок їх здатності скорочуватися та розслаблюватися. Крім того, вони сприяють пасивній механічній поведінці шляхом реконструкції компонентів позаклітинного матриксу (колаген, еластинові волокна і протеоглікани), у який вони вбудовані. Порушення в регуляції скорочення ГМК, може, призводити до розвитку важких патологічних станів, які пов'язані зі зміною структури стінки аорти (1, 3).

Судинна стінка аорти має складні патерни регуляції тонусу. Незважаючи на велику кількість досліджень стосовно регуляції тонусу аорти, більшість регуляторних механізмів досі лишаються недослідженими, наприклад, просторові відмінності в регуляції тонусу грудної аорти на всій її довжині, а також зміни в механізмах регуляції аорти за умови патологічних станів, таких, як діабет 2 типу, розуміння яких є важливими для вибору вірної стратегії лікування серцево-судинних патологій в пацієнтів із діабетом (5, 244).

Регуляція тонусу грудної аорти в нормі включає декілька різних механізмів, таких, як нейрогенні, гуморальні, де можна виділити ендотелійзалежні та ендотелій

незалежні (27, 52, 236). До ендотелійзалежних компонентів регуляції тону аорти відносять ендотелійзалежний гіперполяризуючий фактор (**Endothelium Dependent Hyperpolarizing Factor, EDHF**), простаноїди, нітроген II оксид (NO), сірководень (H<sub>2</sub>S). Ендотелійнезалежні механізми включають йонні канали мембрани ГМК судинної стінки такі, як потенціалзалежні кальцієві канали L типу та потенціалзалежні калієві канали родини TRP(**Transient Receptor Potential**) (11, 13, 52). Також відомо, що медіатори симпатичних, парасимпатичних і неадренергічних нехолінергічних (НАНХ) нервів регулюють тонус судин (15, 17, 19).

Відомо, що сигнальні шляхи всіх цих компонентів можуть діяти як одно- так і різнонаправлено, що ускладнює визначення їх індивідуальних внесків у загальний процес регуляції судинного тону (224).

Патологічні стани як, наприклад, діабет, здатні суттєво впливати на функціонування сигнальних шляхів у судинній стінці аорти, подекуди повністю вимикаючи, такі компоненти як EDHF, у той час, як інші компоненти, у якості компенсаторного ефекту (234, 237), збільшують свій внесок, однак деталі цих змін повністю не досліджені та вимагають подальшого вивчення.

Відомо, що родина рецепторів активованих проліферацією пероксисом (**Peroxisome Proliferator Activated Receptor, PPAR**), беруть участь у багатьох фізіологічних процесах за рахунок впливу на експресію ключових клітинних білків, включаючи такі процеси, як енергетичний метаболізм, контроль за проліферацією клітин, запальні реакції та регуляція судинних реакцій. Так у наявній літературі існують розбіжні гіпотези про те, як PPAR здатні впливати на тонус судинної стінки, які включають у себе вплив на NO- і ЦОГ (Циклооксигеназа)-залежні сигнальні шляхи (227, 248), модуляцію каналів родини TPR (TRPC5, TRPM3) (145, 146, 212), ефекти на GPCR (**G-Protein Coupled Receptor**) та кальційзалежні калієві канали, а також ендотелійнезалежні ефекти, пов'язані з експресією та активністю йонних каналів судинної стінки (31, 33, 212).

Рецептори PPAR давно відомі, як ціль для фармакологічної корекції при діабеті, за рахунок їх здатності впливати на енергетичний метаболізм. Однак у ході метааналізів було показано, що активація, наприклад, PPAR- $\gamma$ , специфічними лігандами призводить до ризику виникнення серцево-судинних патологій у пацієнтів, через маловідомі ефекти PPAR- $\gamma$  на серцевий м'яз та на регуляцію тону судинної стінки (23, 24). Висунуті припущення включають вплив лігандів PPAR- $\gamma$  на потенціалзалежні кальцієві та калієві канали, експресію NO-синтаз, при цьому остаточної відповідь на питання не було знайдено (18, 25–27). При цьому, судинні ефекти PPAR- $\gamma$ , ймовірно, можуть відрізнятися в нормі та при патологічних станах, таких, як діабет 2 типу.

## 1.2 Мета та завдання роботи

Метою роботи було визначити кількісне співвідношення різних компонентів холінергічного розслаблення судинної стінки грудної аорти щура, у нормі та при експериментальному цукровому діабеті 2 типу, визначити просторові відмінності в регуляції тонуусу судинної стінки грудної аорти та встановити, як активація PPAR- $\gamma$  його агоністом росіглітазоном впливає на внески компонентів регуляції судинного тонуусу.

Відповідно до мети роботи, були поставлені наступні завдання.

1. Визначити просторові відмінності в регуляції судинного тонуусу в проксимальній та дистальній частині грудної аорти, з використанням методу інтегративного аналізу даних масового РНК секвенування.
2. Визначити кількісне співвідношення внесків NO, ЦОГ, KIR, TRPV4 та внесок неадренергічних нехолінергічних медіаторів сенсорних нервів у ацетилхолінове розслаблення сегментів аорти в нормі методом тензометрії.
3. Визначити, як росіглітазон впливає на внески NO, ЦОГ, KIR, TRPV4 у ацетилхолін-індуковане розслаблення сегментів аорти щурів у нормі.
4. Показати, як змінюється кількісне співвідношення внесків NO, ЦОГ, KIR, TRPV4 у ацетилхолінове розслаблення грудної аорти щурів при експериментальному діабеті 2 типу та визначити, як дія росіглітазону впливає на внески NO, ЦОГ, KIR, TRPV4 у ацетилхолінове розслаблення аорти при діабеті 2 типу.
5. За допомогою методу молекулярного докінгу визначити, чи здатен росіглітазон неспецифічно впливати на йонні канали або сигнальні молекули.

Об'єкт дослідження: Регуляція судинного тонуусу аорти щура.

Предмет дослідження: механізми холінергічного розслаблення аорти щура та їх просторові відмінності; вплив на механізми холінергічного розслаблення PPAR- $\gamma$  в нормі та при експериментальному цукровому діабеті 2 типу.

Методи дослідження: метод тензометрії, біоінформатичні методи: гнучкий та ригідний докінг, інтегративний аналіз даних РНК секвенування, диференційна експресія; статистичні методи.

### **1.3 Новизна**

У роботі було проведено комплексне визначення кількісних внесків компонентів ацетилхолінового розслаблення в нормі та при експериментальному діабеті 2 типу. Показані відсутні раніше відомості про кількісний внесок ефектів міоендотеліальних контактів та KIR каналів у реалізацію ефекту EDHF. Також був наведений кількісний розподіл внесків кальцій-залежних калієвих каналів SK та IK у TRPV4 залежне розслаблення. Ці результати дають комплексне розуміння значимості внесків ендотелій-залежних компонентів регуляції судинної стінки аорти в нормі та при діабеті.

Також було показано, що ефект росіглітазону на судину стінки в нормі та при діабеті опосередкований впливом на NO, ЦОГ та TRPV4, але не на EDHF. Крім, того вперше було показано, що ефект росіглітазону, може, зменшуватися за рахунок інгібування активності гуанілатциклази, вказуючи на її визначну роль у реалізації ефектів росіглітазону. Разом із цим використовуючи метод молекулярного докінгу було виявлено здатність росіглітазону неспецифічно зв'язуватися з гуанілатциклазою, та двопородоменими калієвими каналами TWIK та TRAAK.

Також методом інтегративного аналізу даних РНК секвенування був виявлений патерн диференційної експресії між проксимальною та дистальною частиною грудної аорти. Зокрема, уперше був показаний більший внесок KIR та потенціалзалежних кальцієвих каналів L типу в дистальній частині грудної аорти щура в нормі.



## 1.4 Практична значимість результатів

Наведені в роботі результати вказують на складні патерни регуляції тону судинної стінки аорти в нормі та при експериментальному діабеті 2 типу та ефект типового антидіабетичного препарату росіглітазону на них. Нами було показано, що вплив росіглітазону на серцево-судинну систему, може, бути опосередкований через прямий вплив на сигнальні молекули. Зокрема, було показано, що ефект росіглітазону зумовлений впливом на гуанілатциклазу, а не на NO синтазу, як вважали раніше. Оскільки препарати типу росіглітазону були вилучені з використання, зокрема, через їх небажанні ефекти на серцево-судинну систему, інформації про те, який саме елемент відповідає за ці небажанні ефекти, може, бути цікавим для наукової та фармакологічної спільноти при розробці нових тiazолідиндіонів, що матимуть мінімальний вплив на серцево-судинну систему. Також, отримані дані свідчать про необхідність детального контролю за можливими неспецифічними ефектами препаратів родини тiazолідиндіонів, оскільки вони здатні впливати на значну кількість йонних каналів та сигнальних молекул.

Крім, того показана відмінність у розподілі ефектів KIR каналів, та кальцієвих каналів L типу в дистальних та проксимальних ділянках грудної аорти щура, що, може, бути корисною для наукової спільноти оскільки дозволить більш якісно контролювати варіацію в дослідженнях судин за рахунок знання про відмінні внески наведених елементів у регуляцію різних ділянок.

## **1.5 Особистий внесок**

Усі біоінформатичні дослідження повністю запропоновані та здійснені автором, а повний обсяг експериментальних фізіологічних досліджень був повністю виконаний автором. Оформлення графічних матеріалів, статистичний аналіз, дизайн експерименту, написання всіх статей та аналіз літератури, та формулювання висновків здійснені за рекомендаціями наукового керівника.

## **1.6 Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дослідження виконувалися в рамках планів науково-дослідних робіт Відділу нервово-м'язової фізіології Інституту фізіології ім. акад. О.О. Богомольця НАН України, а саме за темами «Іонні канали — рецептори фізико-хімічних впливів у регуляції збудження-скорочення вісцеральних м'язів у нормі та патології» (номер державної реєстрації 0118U007351) та «Іонні канали як мішені фармакологічного впливу» (номер державної реєстрації 0124U001683)

## **1.7 Апробація результатів роботи**

Отримані в ході роботи результати було представлено дисертантом на ІХ з'їзді Біофізичного товариства (Київ 2023), ІV міжнародній науково-практичній конференція PERSPECTIVES OF CONTEMPORARY SCIENCE: THEORY AND PRACTICE (Львів 2024), ІХ міжнародній науково-практичній конференція MODERN PROBLEMS OF SCIENCE EDUCATION AND SOCIETY (Київ 2023), XXI Міжнародній науковій конференції «ШЕВЧЕНКІВСЬКА ВЕСНА: ДОСЯГНЕННЯ В НАУКАХ ПРО ЖИТТЯ/ADVANCEMENTS IN LIFE SCIENCES» (Київ 2024), та на науково-практичній конференції XXII читання ім.В.В. Підвисоцького (Одеса 2024). Крім того, результати доповідалися на аспірантському семінарі Інституту фізіології ім. акад. О.О. Богомольця НАН України.

## **1.8 Публікації**

Представлені в дисертаційні праці результати були опубліковані в науковій пресі у вигляді 7 публікацій, зокрема, у 2 статтях у фахових журналах (з яких 1 міжнародний та 1 національний), а також у 5 збірниках тез конференцій та симпозіумів.

## **1.9 Структура та обсяг роботи**

Дисертація складається з розділів «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи», «Результати та обговорення», «Висновки», «Список використаних джерел». Результати проілюстровано 46 рисунками та 4 таблицями. Загальний обсяг роботи складає 136 сторінок. У дисертації містяться посилання на 257 найменувань спеціальної літератури

## Список умовних скорочень

ГМК —	Гладеньком'язова клітина
НАНХ —	неадренергічні, нехолінергічні
РНК —	Рибонуклеїнова Кислота
ДНК —	Дезоксирибонуклеїнова кислота
СТЗ —	стрептозоточин
EDHF —	Endothelium Dependent Hyperpolarizing Factor, ендотелійзалежний гіперполяризуючий фактор
TRP —	Receptor Potential cation channel, катіонний канал транз'єнтного рецепторного потенціалу
TRPV4 —	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4
PPAR —	Peroxisome Proliferator Activated Receptor, Рецептори активовані проліферацією пероксисом
ЦОГ —	Циклооксигеназа
GPCR —	G-Protein Coupled Receptor, G-білок спряжений рецептор
KIR —	K inward rectifying potassium channels, калієві канали вхідного випрямлення
SK —	Кальційзалежні калієві канали малої провідності
IK —	Кальційзалежні калієві канали проміжної провідності
BK —	Кальційзалежні калієві канали великої провідності
TRAAK —	Potassium two pore domain channel subfamily K member 4, Двопородомений калієвий канал, підродина К, член 4
TWIK —	Potassium two pore domain channel subfamily K member 3, Двопородомений калієвий канал, підродина К, член 3
eNOS —	Ендотеліальна NO синтаза
cGMP —	циклічний гуанозин монофосфат
RXR —	Ретиноїдний X рецептор

PPREs	— Peroxisome Proliferator Response Elements, Елементи відповіді на проліферацію пероксисом
LBD	— Ліганд Зв'язуючий домен
DBD	— ДНК Зв'язуючий домен
SUMO	— Small Ubiquitin-like Modifier, малий убіквітин-подібний модифікатор
PLC	— фосфоліпаза C
PKC	— протеїнкіназа C
NCOR	— Nuclear Receptor Co-Repressor 1, ядерний рецептор корепресор-1
NFkB	— Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, ядерний фактор каппа легкий ланцюг енхансера активованих В клітин
iNOS	— індуцибельна NO синтаза
HDAC3	— гістондеацетилаза 3
AUC <sub>0-∞</sub>	— площа під кривою толерантності до глюкози
PCA	— аналіз головних компонент
LRT	— тест співвідношення ймовірності
FDR	— частота помилкових відкриттів
LFC	— log <sub>2</sub> foldChange, логарифм кратності зміни

## 2 Огляд літератури

### 2.1 Особливості анатомії та функціонування аорти

Аорта є найбільшою судиною організму, вона починається з лівого шлуночка та продовжується дугою аорти, що спускається донизу, як проксимальна грудна аорта. Далі вона проходить через грудну порожнину, де на рівні діафрагми продовжується у вигляді черевної аорти, та рухається далі вздовж хребта. Вздовж довжини аорти від неї відгалужуються 11 пар міжреберних артерій та на рівні черевної аорти відгалужуються ниркові артерії.

Основні властивості аорти включають її еластичність та здатність динамічно реагувати на сигнали, скорочуючись чи розслаблюючись (28–30). Саме завдяки притаманній аорті еластичності вона, може, розширюватися та скорочуватися синхронно з кожним серцевим циклом, забезпечуючи неперервний кровообіг. Крім того, аорта виконує функцію механічного буфера, поглинаючи різкі сплески тиску для захисту менших судин від надлишкового навантаження та підтримує стабільний кров'яний тиск. Незважаючи на значну довжину, аорта вважалася функціонально одноманітною вздовж усієї довжини з мінімальними відмінностями в здатності до розтягнення, що зростає від проксимального до дистального кінця, та в більшій пропорції гладенько-м'язових клітин у дистальних частинах аорти (31–33).

Судинна стінка аорти, як і інших артерій складається, з трьох основних шарів: *tunica intima*, *tunica media* та *adventitia*, кожен із яких має свої унікальні клітинні складові та функції (34–40)

1. *Tunica intima* (внутрішня оболонка) вистелена ендотеліальними клітинами. Ці клітини мають ключову роль у контролі над потоком крові, регуляції судинного тону та вивільненні важливих сигнальних молекул, таких нітроген II оксид (NO), сірководень (H<sub>2</sub>S) та ендотеліни тощо. Крім того, у *Tunica intima* можуть бути присутні

також фібробласти (з яких складається базальна мембрана, що відділяє *tunica intima* від *tunica media*) та макрофаги, які допомагають у захисті та відновленні судинної стінки в разі пошкоджень чи запалення (35, 41).

2. *Tunica media* (середня оболонка): складається переважно з ГМК, які відповідають за зміну судинного тонуусу та регуляцію діаметру судин. ГМК також слугують еластичними елементами, що забезпечують стійкість та еластичність судин. У деяких випадках у *tunica media* також можуть бути присутні інші типи клітин, такі як, макрофаги та прогеніторні клітини, що є необхідними для розвитку імунних реакцій та відновленню пошкоджень, але головною складовою залишаються ГМК (34, 39).

3. *Adventitia* (зовнішня оболонка): містить фібробласти, які виробляють колагенові та еластинові волокна, що забезпечують міцність та є структурним каркасом судини. Крім того, до *adventitia* можуть прилягати адипоцити, які забезпечують енергію та термічну і фізичну ізоляцію для судин, а також інші клітинні компоненти, такі, як, перицити, які допомагають у підтриманні та відновленні судин (38)

4. *Vasa vasorum* (Судини судин): враховуючи значну товщину аорти та багатьох інших судин, їм може, знадобиться власне кровопостачання для забезпечення їх життєздатності. Цю функцію виконують *vasa vasorum*, які оточують судини та часто проходять всередині *tunica media* для того, аби жити гладенькі м'язи.

В аорті *vasa vasorum* мають різне походження залежно від ділянки аорти — так у районі дуги аорти, вони походять із коронарних артерій, у грудній аорті — *vasa vasorum* походять від міжреберних артерій. У черевній аорті *vasa vasorum* так само походять від міжреберних артерій, але при тому вони є меншим, та проходять у *tunica intima* (38, 42, 43).

5. *Нервові терміналі та закінчення* в стінці аорти є необхідними для іннервації гладеньких м'язів, та регулювання їх скоротливої активності за рахунок вивільнення нейромедіаторів. Ці нервові закінчення належать до симпатичної та парасимпатичної нервової системи та є відгалуженням блукаючого нерва.

Також у аорті наявні сенсорні нервові закінчення — вони відповідають за збір інформації про стан аорти за рахунок барорецепторних властивостей та дають змогу динамічно регулювати скоротливість аорти у відповідь на зміни в тиску (44).

### 2.1.1 Ендотелій

Ендотелій, основна складова *tunica intima*, відіграє ключову роль у функціонуванні кровоносних судин, контролюючи різноманітні аспекти кровообігу та обміну речовин. Він забезпечує внутрішню вистилку судин та є першою шаром взаємодії з кров'ю. Морфологічно ендотеліальні клітини мають плоску форму та щільно прилягають одна до одної, утворюючи моношар в оболонці судини. Вони взаємодіють із ГМК та контролюють тонус судин шляхом синтезу та вивільнення різноманітних вазоактивних речовин, таких як NO та ендотелін (35, 45).

Однією з головних функцій ендотелію є регулювання судинного тону, що впливає на кровотік та артеріальний тиск. Він виробляє фактори, які спричиняють або інгібують скорочення ГМК, тим самим, впливаючи на діаметр судин та опір кровотоку (36). Ендотелій запобігає агрегації тромбоцитів та утворенню тромбів. Він виробляє фактори, які можуть сприяти або запобігати згортанню крові, забезпечуючи гомеостаз судин (5, 46)

Крім того, ендотелій забезпечує перенесення поживних речовин, кисню та інших молекул із крові до навколишніх тканин та клітин, а також регулює проникність судинної стінки, контролюючи обмін між судинним ложем та тканинами. Так само, як і у великих судинах, у капілярах ендотелій відповідає за проникність газів та поживних речовин, чим активно регулюють живлення тканин та їх постачання киснем (39).

Загалом, ендотелій відіграє ключову роль у забезпеченні оптимального функціонування судин та здоров'я всього організму. Ендотеліальні клітини відіграють важливу роль у підтриманні оптимального функціонування кровоносної системи.



Ендотеліальні клітини також взаємодіють із ГМК за допомогою щільних контактів у віконцях базальної мембрани між tunica media та tunica intima, що дозволяє передавати сигнали у вигляді сигнальних молекул чи йонних струмів та відповідно координувати діяльність гладенького м'язу (47). Крім того, ендотелій впливає на процес вазодилатації через продукцію газотрансмітерів таких як, NO, H<sub>2</sub>S, що є залученими в паракринне сигналювання. Ці медіатори сприяють розслабленню судини та зниженню опору, що сприяє підтриманню нормального кровообігу (36).

Розлади в роботі ендотеліальних клітин можуть призвести до порушень у регуляції судинного тонуусу та кровотоку, що, може, впливати на різні аспекти функціонування судин та серця. Ці порушення можуть бути пов'язані з різними механізмами, включно з патологіями в роботі йонних каналів, міоендотеліальну передачу та кальцієве сигналювання. Крім того, ендотелій грає важливу роль у розвитку судинної мережі, будучи одним із факторів, що регулюють васкулогенез, ангиогенез та атерогенез (47, 48).

Ендотеліальні клітини також виявляють чутливість до механічних подразників, пов'язаних із кровотоком, та перетворюють ці механічні подразники в біологічні сигнали, що впливають на судинні реакції. Механічна чутливість судини пов'язана з механочутливими йонними каналами, які здатні детектувати подразнення у вигляді тиску, розтягнення чи зсуву рідини (Shear stress). Завдяки особливостям їх роботи, швидкість реагування на механічні подразники в судинах є надзвичайно швидкою (49, 50).

Узагальнюючи, ендотелій виконує різноманітні функції, які є критичними для фізіології аорти та підтримання нормального кровотоку.

### 2.1.2 Гладеньком'язові клітини

Гладеньком'язові клітини в судинній стінці відповідають за формування тону судин через свою здатність до динамічного скорочення та розслаблення. Морфологічно ГМК мають вигляд сильно витягнутих веретеноподібних клітин із великим ядром, яке знаходиться в центрі веретена. Вони можуть досягати довжини до 200 мікрометрів та мати діаметр близько 5 мікрометрів. У судині вони формують багат шаровий м'язовий шар, який є функціональним синцитієм завдяки наявності щільних контактів між клітинами, що дає змогу синхронізувати їх активність. ГМК містять інвагінації уздовж плазматичної мембрани — кавеоли, де кластеризуються йонні канали та рецептори, що є необхідними для детекції та трансдукції сигналів про скорочення чи розслаблення (39, 40, 51–53).

Також ГМК активуються нейромедіаторами, аутокринними та паракринними гормонами, такими як, норадреналін, адреналін та ангіотензин II, через мембранні GPCR і внутрішньоклітинні вторинні посередники. Активація мембранних рецепторів ГМК призводить до надходження йонів  $Ca^{2+}$  через кальцієві канали плазматичної мембрани та мобілізації катіону з внутрішньоклітинних кальцієвих депо (через інозитол-3-фосфат — та ріанодинчутливі кальцієві депо саркоплазматичного ретикулуму ГМК). Ще одним механізмом надходження кальцію в ГМК є неселективні катіонні канали на зовнішній мембрані ГМК (54).

Після активації окремі ГМК синхронізуються із сусідніми клітинами через щілинні контакти, що дозволяє їм реагувати в спільній манері. Окрім того існують міоендотеліальні контакти між ГМК та ендотелієм, що дозволяють передавати різні сигнали від ендотелію до ГМК або навпаки (34). Ці зв'язки дозволяють обмінюватися між клітинами сигнальними молекулами та йонами, такими, як кальцій, калій, циклічні нуклеотиди, чи газотрансмітери та є необхідним елементом у розвитку ендотелій-залежних реакцій.

### 2.1.3 Інші типи клітин

**Адвентиційні фібробласти**, що становлять значну частку клітин *adventitia*, відіграють важливу роль у формуванні жорсткості судинної стінки. Вони виробляють позаклітинний матрикс із колагену та еластину, який утворює каркас тканини та забезпечує механічну міцність судинної стінки, що дозволяє їй витримувати тиск крові. Також ці клітини забезпечують регенеративні властивості та здатні збільшувати чи зменшувати загальну жорсткість судини за рахунок ремоделювання позаклітинного матриксу (37, 38).

**Перицити**, як прогеніторні клітини судинної стінки, виконують різноманітні функції, більшість із яких, пов'язана з регенерацією пошкоджень, ангиогенезом та регулюванню дозрівання популяцій ендотеліоцитів та їх клітинного циклу (38, 39, 55).

## 2.2 Регуляція тону́су судинної стінки аорти

Регуляція тону́су стінки аорти є комплексним явищем, яке включає йонні канали, GPCR, нейромедіатори та гормони, газотрансмітери та механічну стимуляцію. Ці компоненти можуть перетинатися або діяти в протилежних напрямках, що ускладнює регуляцію тону́су стінки аорти.

Один із регуляторних механізмів, регуляції тону́су судин пов'язаний із холінергічною нервовою системою. Компоненти, які беруть участь в ацетилхолін-індукованому розслабленні аорти, можна розділити на декілька відмінних груп, де задіяні різні сигнальні шляхи. Вони включають у себе ендотелійзалежні механізми: ендотелійзалежний гіперполяризуючий фактор (EDHF), NO та простагландини; та ендотелійнезалежні механізми, що пов'язані з йонними каналами на мембрані ГМК. Усі ці компоненти відіграють важливу роль у модуляції складного процесу релаксації аорти, а їх взаємодія створює комплексну мережу сигнальних механізмів (56, 57).

EDHF є одним з основних механізмів, за допомогою якого, ендотелій регулює релаксацію судинної стінки. Існують кілька теорій, які пояснюють природу й дію EDHF. Одна з найпоширеніших теорій пов'язує його з безпосереднім впливом на калієві канали, у той час, як інші — називають газотрансмітери, як більш вірогідне пояснення. Згідно з калієвою теорією EDHF є складним явищем, що включає активацію неселективних каналів родини TRP та локальне зростання концентрації кальцію в примембранному просторі, що викликає активацію кальцій-залежних калієвих каналів — малої провідності (SK), середньої провідності (IK) та великої провідності (BK). У результаті цього відбувається вихід йоннів  $K^+$  з ендотеліальних клітин та їх накопичення в міоендотеліальному просторі, що призводить до гіперполяризації мембрани ГМК і наступного розслаблення. Ця гіперполяризація мембрани ГМК забезпечується калієвими каналами вхідного випрямлення (KIR) (58). Певні дослідження стверджують, що внесок KIR каналів у прояв EDHF, може, складати до

60 % що вказує на їх роль, як необхідного передавача сигналу, хоч вони й не ініціюють сигнал у першу чергу (58–61).

Ще одним важливим ендотелійзалежним регулятором тону судин є NO, що має значний вплив на судинний тонус володіючи, при цьому потужними вазодилатаційними властивостями. У межах судинної стінки, за нормальних умов, NO синтезується ендотеліальною кальційзалежною NO-синтазою (eNOS) з L-аргініну. Механізм його дії включає паракринну сигналізацію, де він діє на оточуючі клітини, спричиняючи вазодилатацію ГМК посередньо через активацію гуанілатциклази та утворення циклічного гуанозинмонофосфату (cGMP), який у свою чергу через протеїнкіназу G веде до інактивації кальцієвих каналів мембрани ГМК та фосфорилування міозину, що в підсумку сприяє релаксації ГМК. NO паралельно з EDHF, може, виділятися у відповідь на вхід кальцію в ендотеліальну клітину, однак, крім того, NO має певний постійний рівень базальної секреції (62, 63).

Простагландини також є потужними вазодилаторами, що напручуються ферментом циклооксигеназою (ЦОГ) 1/2. Їх дія також має паракринний ефект та веде до активації тромбоксан-простаноїдних рецепторів на ГМК, де в подальшому вони зазвичай діють посередньо протеїнкінази A де, подібно до NO, вони викликають вазодилатацію шляхом фосфорилування легких ланцюгів міозину та інактивації потенціалзалежних кальцієвих каналів мембрани ГМК (64, 65).

Ендотелійнезалежні механізми пов'язані з активацією каналів або рецепторів на мембрані ГМК. Так, ендотелійнезалежне розслаблення, може, викликатися безпосередньою активацією кальцій-залежних калієвих каналів на ГМК, чи потенціалзалежних калієвих каналів за рахунок лігандів, чи інших механізмів активації (6, 66–68).

Ще один компонент, що регулює тонус судини пов'язаний із нехолінергічним неадренергічним механізмом. Наприклад, вивільнення із сенсорних нервових закінчень таких потужних вазодилаторів, як кальцитонін ген-зв'язаний пептид та

субстанція Р на стимуляцію ацетилхоліном, та які можуть діяти через NO-залежні або KIR-залежні шляхи, спричиняючи розслаблення аорти (69, 70).

### **2.3 Роль TRP каналів у регуляції судинного тону**

Рецептори транз'єнтного потенціалу (Transient Receptor Potential, TRP) є групою неселективних катіонних каналів, що в основному є проникними для йонів кальцію, і натрію та мають різноманітну модальність у всіх їх представників. Вхід катіонів через канали TRP призводить до мембранної деполяризації, що ініціює вхід йонів кальцію через потенціалзалежні кальцієві канали та розвиток подальшого сигнального каскаду (71).

Надродина каналів TRP складається з 28 представників, які поділяються на 6 підкласів залежно від їх молекулярних та біофізичних властивостей. За гомологією їх генетичної послідовності та лігандами канали TRP можна поділити на такі групи: TRPC (канонічний), TRPV (ванілоїдний), TRPM (меластиновий), TRPA (анкериновий), TRPP (поліцистиновий) та TRPML (лептиновий).

Канали TRP можуть бути активовані різними стимулами, такими, як температура, світло, хімічні ліганди та механічні й осмотичні впливи. Функціонально канали TRP складаються із чотирьох субодиниць, кожна із шести трансмембранних спіралей, і можуть існувати, як у гомомерній, так і в гетеромерній формі. Крім того, усі канали TRP мають консервативний домен TRP-box, що складається із шести амінокислот і, ймовірно, пов'язаний зі зв'язуванням фосфатидилінозитулу цим каналом (72).

Канал TRPV4, який є членом родини рецепторів транз'єнтного потенціалу родини ванілоїдів, відіграє важливу роль у регуляції тону судинної стінки. Його присутність виявлено у внутрішніх органах, серцево-судинній та нервовій системі. TRPV4 канал є проникним для кальцію, натрію і магнію, однак із найбільшою проникністю для кальцію.

Молекулярна будова TRPV4 включає в себе шість трансмембранних сегментів із поровим доменом, розташованим між 5-м та 6-м сегментами. Білок складається з 871

амінокислот і формує гомотетрамерні структури, а його N-термінальний кінець має шість анкеринових повторів (72).

TRPV4 може, бути активований різними подразниками, включаючи температурну чутливість (від 27 °C), механічний стрес (наприклад, розтягнення мембрани внаслідок руху крові) та хімічні ліганди такі, як ендоканабіноїди, арахідонова кислота та її похідні. Один з основних ендогенних агоністів TRPV4 — ейкозотрієнові кислоти, які спричиняють гіперполяризацію мембрани ГМК судин, що призводить до їх розслаблення. Цей ефект залишається, навіть у випадку блокування NO-синтази, що вказує на зв'язок TRPV4 з EDHF (73–77)

Порушення у функціонуванні TRPV4 каналу та мутації в гені, що його кодує, можуть призводити до різноманітних патологічних станів (дисплазії, м'язові атрофії, порушення сечовиділення, аллоденію та гіпертензію). Велика кількість пов'язаних захворювань свідчить про широку експресію та важливість функцій, які виконує канал TRPV4 у організмі (75).

Дослідження показали, що експресія TRPV4 присутня, не, лише в ендотеліальних клітинах, але також у ГМК аорти й деяких інших судин. Ця експресія була підтверджена за допомогою різних методів таких, як імунофлюоресцентні дослідження, вестерн-блот, ПЛР з однієї клітини та електрофізіологічні дослідження (72, 78–81)

У клітинах судинної стінки канал TRPV4 виконує різні функції такі, як реакція на зміни осмотичного тиску, ремоделювання поверхні ендотеліоцитів у відповідь на механічний стрес, зміни в експресії генів, регуляція міграції та агрегації ендотеліоцитів та в першу чергу ендотелій-залежне розслаблення судин.

Ефекти TRPV4 можуть включати, як розслаблення, так і скорочення залежно від типу клітин, у яких ця активація відбувається. Так активація TRPV4 у ендотелії веде до розслаблення судинної стінки, у той час, як активація TRPV4 у ГМК у більшості випадків викликає скорочення ГМК. По-перше, активація TRPV4 в ендотеліальних клітинах, може, локально збільшувати внутрішньоклітинну концентрацію кальцію, що

у свою чергу призводить до активації кальцій-залежних калієвих каналів, таких як BK, IK, SK. Це викликає гіперполяризацію мембрани ГМК через міоендотеліальні контакти, та через зростання концентрації  $K^+$  у міжклітинному просторі судинної стінки, що, може, бути додаткова підсилена за рахунок KIR каналів, забезпечуючи розслаблення судинної стінки (82).

По-друге, підвищення внутрішньоклітинного рівня кальцію в ендотеліоцитах, може, активувати кальційчутливу фосфоліпазу A2, що призводить до вироблення арахідонової кислоти. Ця кислота метаболізується ліпоксигеназою до епоксидних кислот, які вивільняються з ендотеліоцитів та можуть взаємодіяти з каналом TRPV4 каналом на мембрані ГМК судин. Це також призводить до зростання концентрації кальцію усередині м'язової клітини, що, може, бути підсилене за рахунок мобілізацій кальцію з ріанодинчутливого/інозитол-3-фосфатчутливого кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулуму ГМК та в подальшому може, викликати скорочення гладенького м'язу судини. Однак, у певних дослідженнях було показано, що активація TRPV4 у судинах здатна викликати розслаблення за механізмом аналогічним, тому що наявний в ендотеліальних клітинах — через взаємодію з кальцій-залежними калієвими каналами (83).

Також важливо відзначити, що TRPV4 канал, може, утворювати функціональні комплекси з калієвими каналами, такими як BK, IK, SK, як у гладеньких м'язах, так і в ендотеліальних клітинах. Ці функціональні комплекси включають колокалізацію каналів TRPV4 з кальцій-залежними калієвими каналами, де вони розташовуються поруч один з одним на одному ліпідному рафті (60, 84).

Таким чином, канал TRPV4 відіграє ключову роль у механізмах вазодилатації, які залежать від кальцію, а також, може, бути активований механічними впливами, що робить його важливим ендотеліальним механосенсором.

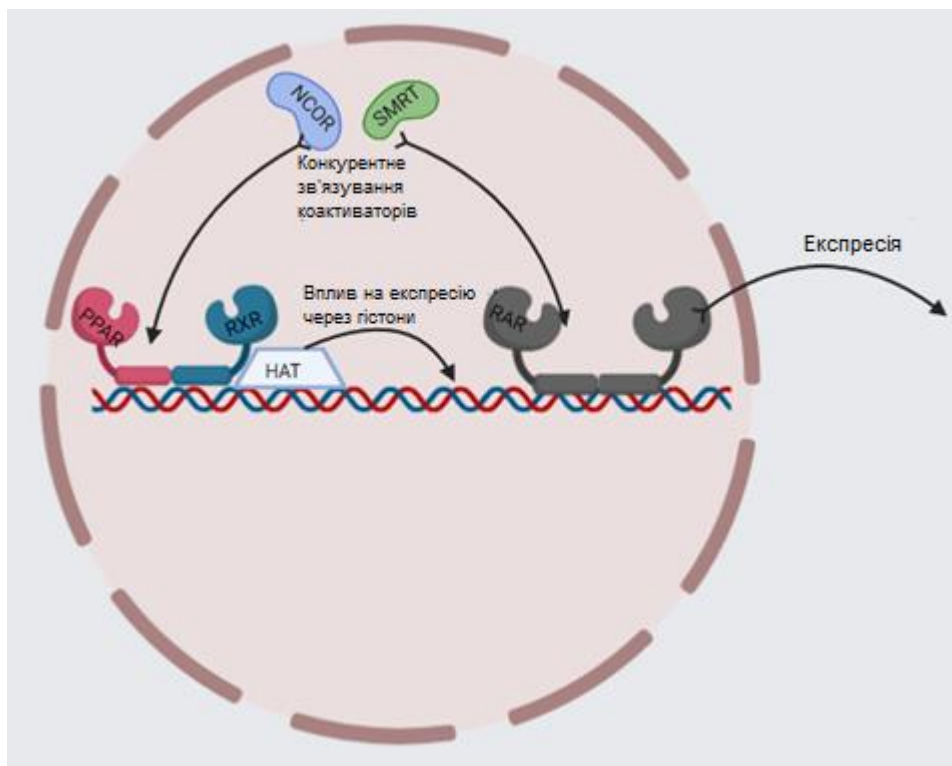


## 2.4 Роль PPAR-γ рецепторів у регуляції тону судинної стінки

Ядерні рецептори є групою складних клітинних регуляторних систем, які регулюють експресію генів та біосинтез білків — фундаментальну відповідь клітини на різні сигнали. Ці рецептори розподілені по різноманітних клітинних компартментах, але мають спільний механізм — після зв'язування з лігандом вони активують специфічні елементи відповіді, викликаючи формування транскрипційних комплексів. PPAR-γ є типовим представником цієї групи.

Назва PPAR — Peroxisome Proliferator Activated Receptor виникла на основі досліджень на гризунах, де активація PPAR-α корелює зі збільшенням кількості пероксисом та рівнем пероксисомних ферментів. Незважаючи на те, що це явище спостерігається в експериментальних тварин PPAR не регулюють проліферацію пероксисом у людей. Основною функцією PPAR у організмі є регулювання транскрипції генів у різних тканинах, включаючи жирову, м'язову, печінкову, імунну систему, серцевий м'яз та судини (85, 86).

Серед добре відомих підтипів у цій родині виділяють — PPAR-α, PPAR-β та PPAR-γ — кожен характеризується відмінними транскрипційними патернами, активаторами та регульованими генами. Після активації лігандом PPAR утворюють гетеродимери з ретиноїдними X рецепторами (RXR), транслокуються в ядро та зв'язуються з їх елементами відповіді на пероксисомний рецептор (PPREs) у ДНК (Рис. 2.4.1) (87–92)



**Рис. 2.4.1 Схематичне зображення роботи PPAR-γ рецептора.**

Його зв'язування з RXR та з коактиваторам, та корепресорами разом із підсиленням експресії за рахунок дії гістон ацетилтрансферази.

Механізми, що регулюються PPAR охоплюють окислення ліпідів, запалення та вазодилатацію, із залученням до патогенезу таких хвороб, як рак, атеросклероз, ожиріння та діабет. У класичних випадках PPAR активуються такими зовнішніми лігандами, як вітамін D, тiazолідиндіони, фібрати та жирні кислоти, що підкреслює їхні різноманітні функції, включаючи регулювання рівня глюкози та ліпідів, диференціацію тканин та протизапальні ефекти (86, 93, 94).

Структура та розподіл підтипів рецепторів родини PPAR включають у себе значний молекулярний ландшафт, що визначає їх різноманітні функціональні ролі та специфічність лігандів. Є три відомі підтипи — PPAR-α, PPAR-β та PPAR-γ — рецептори, що є кодованими різними генами на 22 хромосомі, мають консервативну молекулярну архітектуру, подібну до інших ядерних рецепторів. Ця архітектура включає A/B регіони, важливі для фосфорилування та транскрипційної регуляції; домен зв'язування з ДНК (DBD), який має два сайти зв'язування із цинком, що є необхідними для міцної взаємодії з ДНК; та домен зв'язування з лігандом (LBD), який

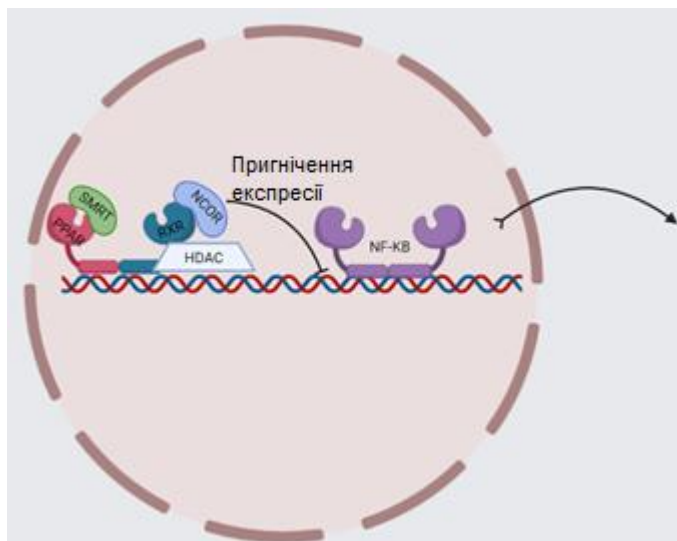
містить гідрофобний сайт зв'язування, що є необхідним для зв'язування ліганду та подальшому рекрутингу коррегуляторів (95–97).

Хоча загальна структура залишається подібною для всіх підтипів, існують незначні відмінності, особливо в LBD. Наприклад, PPAR- $\gamma$ , демонструє унікальну специфічність у зв'язуванні певних лігандів, що підкреслена його участю в різноманітних фізіологічних процесах у різних тканинах, включаючи біосинтез ліпідів, адипогенез та регулювання імунної системи. Загалом, структурні особливості та різноманітність у тканинному розподілі підтипів PPAR підкреслюють їх невід'ємну роль в організації різноманітних фізіологічних процесів (87, 98, 99).

Транскрипційна активність PPAR є комплексним механізмом, що тонко керує експресію генів у відповідь на різноманітні клітинні сигнали. Після активації лігандами або через ліганднезалежні шляхи такі, як фосфорилування, PPAR транслокуються до ядра. У своєму базальному стані PPAR формують гетеродимерні комплекси з RXR та корепресорними білками, такими як NCoR та SMRT, які пригнічують транскрипцію, модифікуючи гістони (96, 100–102).

Коли ліганди зв'язуються з LBD PPAR, відбувається звільнення корепресора, що сприяє залученню коактиваторів, таких як p300 та SRC-1. Цей звільнений комплекс PPAR-RXR потім зв'язується зі специфічними послідовностями ДНК — PPRE, ініціюючи утворення зрілих транскрипційних комплексів та транскрипцію генів (23, 91, 99).

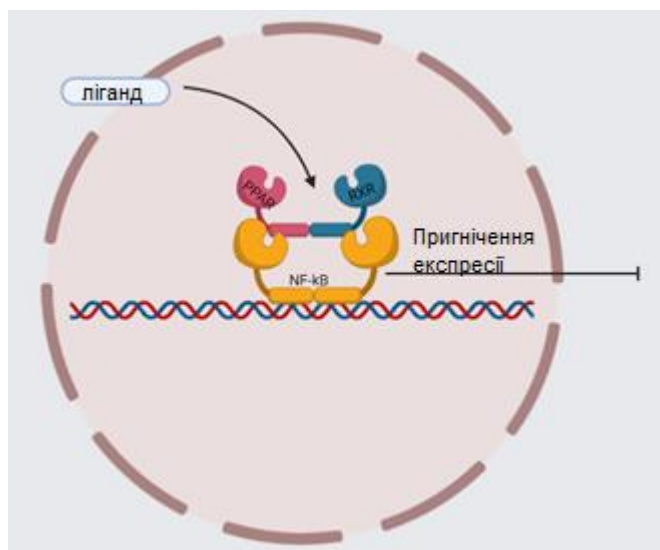
PPAR залучені до трансактивації, де активні комплекси PPAR-RXR, допомагаючи коактиваторам (Рис. 2.4.2), модифікують структуру хроматину для полегшення транскрипції, навіть у ліганд-незалежний спосіб через SUMOїлювання (88, 103–105).



**Рис. 2.4.2 Схематичне зображення процесу трансактивації.**

Комплекс PPAR-RXR, та їх відповідні коактиватори активують гістонацетил трансферазу та полегшують зв'язування відповідних транскрипційних факторів до PPAR- $\gamma$  незалежних генів.

А також вони залучені до транспресії, що навпаки включає в себе інгібування активності інших факторів транскрипції або шляхом конкуренції за зв'язування з коактиваторами, або безпосередньою модуляцією доступності хроматину за рахунок його ремоделювання (Рис. 2.4.3) (88, 100, 106, 107).



**Рис. 2.4.3. Схематичне зображення процесу транспресії**

Комплекс PPAR-RXR, зв'язується з ліганд-зв'язуючими доменами інших рецепторів, таких як Nf-kB, або із сайтами зв'язування коактиваторів, зменшуючи вірогідність активації цих рецепторів.

PPAR- $\gamma$  здійснює свій регуляторний вплив на безліч генів, що демонструє його ключову роль у різноманітних фізіологічних процесах. Нижче наведені найбільш добре дослідженні елементи, які є регульованими впливом PPAR- $\gamma$ :

### **Адипогенез:**

*adipoq*: Кодує адипонектин, важливий сигнальний білок, що регулює обмін речовин (108).

*lpl*: Кодує ліпопротеїнліпазу, необхідну для розщеплення тригліцеридів та зберігання жирних кислот (109).

*nr1h3*: Кодує ядерний рецептор, що бере участь у ліпідному гомеостазі, запаленні та обміні холестерину (110).

*ucp1*: Кодує роз'єднувач електрон-транспортного ланцюга 1, необхідний для адаптивного термогенезу в бурих адипоцитах (111).

*Prdm16*: Транскрипційний фактор, що модулює термогенез у жировій тканині (112).

*Ppara*: Інший підтип PPAR, важливий для функціонування жирової тканини (113).

### **Метаболізм жирних кислот та транспорт ліпідів:**

*angptl4*: Регулює внутрішньоклітинний ліполіз та вивільнення жирних кислот (114).

*apoe*: Регулює зв'язування та транспорт ліпопротеїнових частинок усередину клітин (115).

*olr1*: Кодує лектиновий рецептор, важливий для транспорту ліпопротеїдів та проліферації судинних гладеньких м'язів (116).

*acadm, acadl, acox1*: Ферменти, що відповідають за окислення ліпідів та бета-окислення жирних кислот (117).

### **Інсуліновий сигналінг:**

*dgat1*: Кодує діацилгліцерол ацилтрансферазу, яка бере участь у біосинтезі тригліцеридів та запаленні (118).

*pck1*: Кодує фосфоенолпіруват карбоксикиназу, важливу в шляху глюконеогенезу (119).

*cpt1a*: Кодує карнітинпальмітоїл трансферазу, ключовий фермент у окисленні жирних кислот (117).

*kcnj6*: Кодує потенціал-залежний калієвий канал, важливий для секреції інсуліну (27).

## Судинні реакції

*rgs5*: Регулятор GPCR, таких, як ангіотензин II-рецептор (120).

*ednrb*: Кодує ендотеліновий рецептор В, що сприяє вазодилатації (121).

*sod1*: Кодує супероксиддисмутазу Cu/Zn (122).

*vegfa*: Кодує ендотеліальний фактор росту судин (123).

*kcnd2*: Потенціал залежні калієві канали, що спричиняють вазодилатацію (124).

*scnn1g*: Кодує гамма субодиниці ENaC, що бере участь у судинній регуляції (125).

Важливість PPAR- $\gamma$  підкреслюється летальністю його нокаут у мишачих ембріонах.

PPAR- $\gamma$  включений у різноманітні сигнальні шлях. Основний механізм, у якому PPAR- $\gamma$  бере участь — це регуляція обміну ліпідів у жирових тканинах, білого чи бурого кольору. Після активації PPAR- $\gamma$  транслокується до ядра, де активує експресію білків-транспортерів ліпідів, таких як CD36 транспортер жирних кислот, який зв'язується з ліпопротеїнами низької щільності в крові та сприяє їх транслокації в клітину. Наступною мішенню активованого PPAR- $\gamma$  є гени ацил-СоА синтетази (ЕС 6.2. 1.1). Іншою мішенню, що регулюється PPAR- $\gamma$ , є гени, що кодують білки, які регулюють внутрішньоклітинний транспорт ліпідів (такі, як карнітинпальмітоїл трансфераза ЕС 2.3.1.21) та ліпопротеїн ліпаза (ЕС 3.1. 1.34), які регулюють мітохондріальне поглинання жирних кислот та їх участь у метаболічних процесах. Ще один ефект на обмін ліпідів відбувається через гени ферментів, що беруть участь у бета-окисленні ліпідів (такі, як ацил-СоА-дегідрогеназа ЕС 1.3. 8.1), роль якої полягає в енергетичному перетворенні жирних кислот) та в глюконеогенезі (через такі ферменти як, фосфоенолпіруват карбоксикіназа (ЕС 4.1.1.32), яка важлива для збереження стійкого рівня глюкози через синтез у мітохондріях (126–128)

Інший шлях, у якому бере участь PPAR- $\gamma$ , — регулювання запалення через вплив на функцію макрофагів. Це відбувається, коли зовнішній ліганд (наприклад, росіглітазон) потрапляє до клітини та зв'язується з PPAR- $\gamma$ . Ця подія, не лише активує транслокацію PPAR- $\gamma$  до ядра, але також викликає SUMOїлювання PPAR- $\gamma$  в лізіні

107, лізині 395 або лізині 365. Транслокація SUMOїльованого PPAR- $\gamma$  до ядра призводить до рекрутингу корепресорного HDAC3 та NCOR на промотори запальних генів. Цей комплекс забезпечує запобігання убіквітинуванню NCOR, оскільки PPAR- $\gamma$ , зв'язаний з NCOR, блокує сайти убіквітинування NCOR, що важливо для його видалення та утворення зрілого транскрипційного комплексу на промоторах деяких генів, наприклад, мішені для NF $\kappa$ B чи iNOS у макрофагах. Відомо, що HDAC3 стабілізує взаємодію між PPAR- $\gamma$  та NCoR, підсилюючи корепресію, що призводить до припинення експресії таких таргетних генів, як прозапальні цитокіни (100, 104, 129, 130).

Протягом більше ніж 20 років PPAR- $\gamma$  розглядається як потенційна мішень для лікування метаболічних порушень, пов'язаних з обміном ліпідів, ожирінням, запаленням та діабетом. На даний момент було відкрито та перевірено на терапевтичний потенціал багато природних і штучних лігандів PPAR- $\gamma$  (93, 97, 131, 132).

Ліганди PPAR- $\gamma$  можна розділити на три різні групи: ейкозаноїди, тіазолідиндіони та фібрати.

Ейкозаноїди — це група окислених похідних 20-карбонових поліненасичених жирних кислот, які виробляються внутрішньоклітинними ферментами циклооксигеназами та ліпоксигеназами. Вони мають високу біологічну активність і зазвичай діють через ядерні рецептори (такі, як PPAR), та йонні канали. Зазвичай ейкозаноїди діють через сигнальний шлях запалення та в ході розвитку імунної відповіді. Найбільш поширеними представниками групи ейкозаноїдів є простагландини, лейкотрієни, ліпоксини та тромбоксани (117, 133).

Тіазолідиндіони — це похідні гетероциклічної сполуки тіазолідину. Вони добре відомі та потужні активатори PPAR, які раніше використовувалися для лікування діабету через їх вплив на PPAR- $\gamma$  та на обмін ліпідів та глюкози. Дві сполуки цієї групи, що були найтипівішими препаратами це — піоглітазон та росіглітазон, але нещодавно їх застосування в лікуванні діабету було обмежено через їх потужний вплив на серцево-

судинну систему та збільшений ризик розвитку раку сечового міхура, що було показано в ході метааналізів (134–137).

Обмеження в медичному застосуванні тiazолідиндіонів змусило вчених почати пошук нових лігандів з еквівалентною афінністю. Відомо, що гексадецил азелоїл фосфатидилхолін (який є ендogenous сполукою, що утворюється при окисненні фосфоліпідів клітинної мембрани), може, активувати PPAR- $\gamma$  в тих самих концентраціях, що й розіглітазон. Дослідження передбачають, що гексадецил азелоїл фосфатидилхолін, може, бути використаний для запобігання апоптозу кардіоміоцитів під час інфаркту міокарда завдяки його протизапальному ефекту та корепресії таких прозапальних факторів, таких як NF $\kappa$ B. Сьогодні гексадецилазелоїлфосфатидилхолін широко використовується, як високоафінний та специфічний ліганд PPAR- $\gamma$  і проходить клінічні випробування, як потенційний лікарський засіб (138–141).

Телмісартан є похідною бензimidазолів і добре відомий як, антигіпертензивний препарат завдяки своїй здатності антагонізувати зв'язування ангіотензину 2 з рецептором ангіотензину 1 (який відповідає за вазоконстрикцію). Пізніше було показано, що телмісартан, може, безпосередньо зв'язуватися з LBD PPAR- $\gamma$  та активувати його, хоча з меншою афінністю порівняно з вищезгаданими лігандами. Цей факт зробив телмісартан більш помітним, як лікарський засіб для лікування серцево-судинних патологій (142–145).

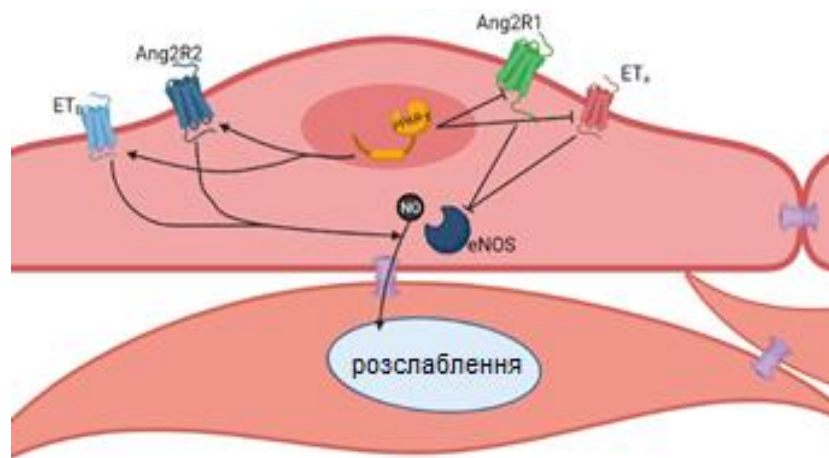
Деякі дослідження показують, що ліганди каналів родини TRP можуть діяти, як неспецифічні агоністи PPAR- $\gamma$ . Виявлено, що масляний ефір терпену, карвакрол, може активувати PPAR- $\gamma$  *in-vitro*. Деякі експерименти показують, що карвакрол підвищує активність лігандів PPAR- $\gamma$  (таких, як піоглітазон), якщо використовується разом із ними. Також дослідження показують, що карвакрол впливає на експресію тих же генів, що й активація PPAR- $\gamma$ , що, може слугувати вторинним доказом їх зв'язку (146, 147).

Відомо, що PPAR- $\gamma$  здатний впливати на вазомоторний тонус через деякі сигнальні шляхи. Основним елементом цього впливу вважають ендотеліоцити, де PPAR- $\gamma$  активується, зв'язуючись із лігандом циркулюючим у крові та переміщується



в ядро, де пригнічує експресію NADPH-оксидази та каталази, що призводить до зменшеної продукції активних форм кисню (що, може спричинити вазодилатацію за рахунок збільшення вироблення NO). Крім того, PPAR- $\gamma$  в ендотелії проявляє захисні та вазодилатаційні ефекти за рахунок індукції експресії рецептора ендотеліну B (який в ендотеліоцитах впливає через шлях PLC-IP3-Ca-PKC на eNOS, а також регулює EDHF який важливий для гіперполяризації та розслаблення гладеньких м'язів), який діє в протилежному напрямку від рецептора ендотеліну A та спричиняє вазодилатацію при активації ендотеліном-1 (Рис. 2.4.4). Крім того, PPAR- $\gamma$  індукує експресію транспортерів жирних кислот, що важливо для виживання ендотелію та енергетичного обміну в ньому. Активація PPAR- $\gamma$  також підвищує рівень крупель-подібного фактора, який виступає посередником для регуляції виживання клітин за рахунок інгібування NF- $\kappa$ B та відповідно процесу запалення (24, 148–151).

**Рис. 2.4.4** Схема впливу PPAR- $\gamma$  на судинні рецептори.



PPAR- $\gamma$  впливає на рецептори ангіотензину та ендотеліну, з підвищенням активності ET $\beta$ , та Ang2R2, та пригніченням активності Ang2R1, та ET $\alpha$ , разом із їх ефектами на ендотеліальну NO синтазу.

У судинній тканині PPAR- $\gamma$  бере участь у сигнальних шляхах вазодилатації та регулює

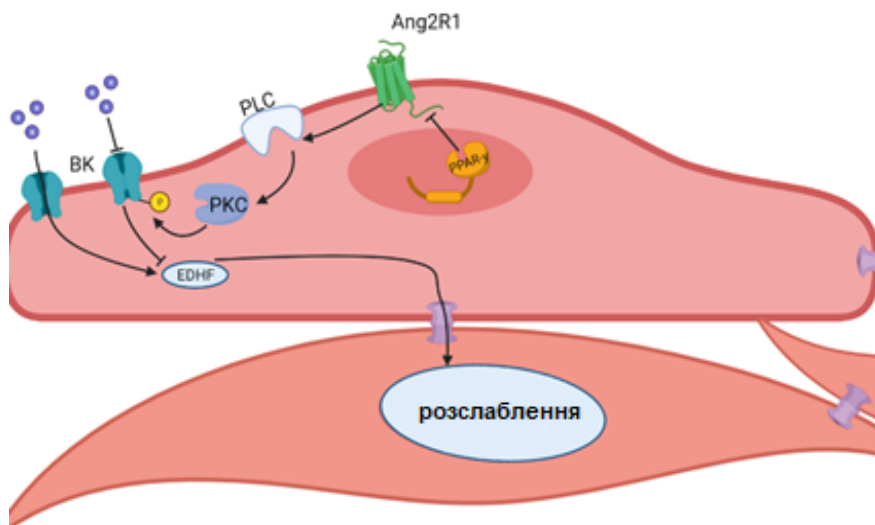
судинний гомеостаз через регуляцію експресії TRPV1 в аферентних нервах, що пов'язані з барорефлексною сигналізацією в периферійній судинній системі. Інші дослідження показують, що вазодилатація, пов'язана з PPAR- $\gamma$ , була інгібована блокаторами потенціал залежних калієвих каналів та калієвих каналів вхідного випрямлення, що вказує на роль PPAR- $\gamma$  у регуляції EDHF. Також є відомості, що дія PPAR- $\gamma$  в ГМК (через ендотелійзалежні механізми) відбуваються за рахунок впливу на

NO, через наразі невідомі механізми, а також за рахунок впливу на рецептори GPCR та їх шляхи (наприклад, рецептор ангіотензину 2) шляхом підвищення їх експресії (26, 152).

Також PPAR- $\gamma$  підвищує експресію куліну-3 в ГМК, що є важливою частиною системи убіквітин-лігази, яка потрібна для регуляції Rho-кінази (яка, може інгібувати активність eNOS) та підвищення активності міозинфосфатази-1 (підвищує скоротливість м'язових волокон), що у свою чергу викликає опосередковане розслаблення. Також PPAR- $\gamma$  підвищує експресію RGS5, що призводить до інгібування функцій рецептору ангіотензину 2 — за рахунок прискорення гідролізу ГТФ та формування неактивних ГДФ-зв'язаних  $G\alpha\beta\gamma$ -гетеротримерів. Якщо рецептор 1 ангіотензину 2 залишається активованим, фосфоліпаза C буде продукувати більше інозитол-3-фосфату та диацилгліцеролу, які можуть активувати (за рахунок кальцію з внутрішньоклітинних депо) протеїнкіназу C, яка, може, інгібувати активність калієвих каналів BK що є важливим елементом вазодилатації через сигнальний шлях EDHF (25, 26, 120, 153, 154)

Однією з відомих мішеней PPAR- $\gamma$  є TRPC6 канал, що відомий як, неспецифічний кальцієвий канал. TRPC6 канал широко експресується в ГМК легневих судин, де він бере участь у регуляції тону м'язів через вхід кальцію. Таким чином, PPAR- $\gamma$  відіграє важливу роль у регуляції ефектів кальцію в легневих ГМК шляхом зниження експресії TRPC6 за допомогою механізму трансрепресії (19, 20).

Ще одним важливим компонентом вазодилатації, що, ймовірно, регулюється PPAR, є гіперполяризація мембран ГМК. Одним із важливих елементів, що її викликають є кальцій-залежні калієві канали — IK, BK, SK. Незважаючи на те, що, сам PPAR- $\gamma$  не є пов'язаним із функціонуванням цих каналів, відомо, що рецептор ангіотензину 2 діє через шлях PLC/PKC та пригнічує активність BK через фосфорилування, також відомо, що PPAR- $\gamma$  пригнічує експресію рецептора ангіотензину 2, таким чином, запобігаючи інактивації BK (Рис. 2.4.5) (120, 155).



**Рис. 2.4.5. Схема впливу PPAR-γ на BK-залежну релаксацію.**

PPAR-γ здатний зменшувати експресію рецептору ангіотензину 1, що у свою чергу веде до дефосфорилування BK каналів, через вплив на протеїнкіназу C, та посиленню ефекту EDHF.

PPAR-γ залучений у значну кількість різноманітних патологій, найбільш типовою, з яких є діабет.

Цукровий діабет, що є метаболічним розладом, який характеризується порушенням сигнальної дії інсуліну дисфункцією його рецептора та неспроможністю підтримувати стабільні рівні глюкози. У дорослих діабет 2 типу часто виникає через недостатню секрецію інсуліну підшлунковою залозою/неправильну продукцію глюкози печінкою та підвищений розклад жирів у жирових тканинах. Тіазолідиндіони, які є лігандами PPAR-γ, широко використовувалися в якості препаратів для лікування діабету через роль PPAR-γ у метаболізмі глюкози. Активація PPAR-γ безпосередньо стимулює ключові елементи, що регулюють глюкозний метаболізм, такі як, глюкозотранспортер GLUT2 та ключовий фермент гліколізу β-глюкокіназа (EC 2.7.1.2). Крім того, PPAR-γ є невід'ємною складовою бета-окислення жирних кислот, ключового процесу в енергетичному метаболізмі та глюконеогенезі. Дослідження показали, що лікування лігандами PPAR-γ не лише змінює склад популяції адипоцитів, але також сприяє утворенню менших, більш інсулін чутливих адипоцитів. Активація PPAR-γ підвищує чутливість до інсуліну не тільки в периферійних тканинах, але й у печінці та β-клітинах підшлункової залози. Цей ефект відбувається через модуляцію сигнальних шляхів, таких як MAPK і Akt, що призводить до покращення

відповіді на інсулін у різних тканинах, пов'язаних з енергетичним метаболізмом (133, 156–161).

## 2.5 Зміни в регуляції тону́су судинної стінки спричинені діабетом

Значна кількість досліджень вказує, що діабет 2 типу впливає на експресію, або на функціонування елементів сигнальних шляхів у судинній стінці таких, як EDHF, NO та TRPV4-залежне розслаблення.

Так, було показано, що в нікотинамід-стрептозотоциновій моделі діабету, експресія TRPV4 у резистивних судинах була меншою порівняно з контролем, окрім того дослідження вказують на те, що розслаблення викликане агоністом TRPV4 каналу GSK101 було меншим, ніж у контролі (162–164). Також було показано, що при діабеті 2 типу експресія каналів SK була пригніченою, разом із тим, що TRPV4-індуковане розслаблення через SK мало слабший ефект. Однак інші дослідження мають розбіжні свідчення щодо експресії каналу IK при діабеті. Частина досліджень вказує на те, що експресія і ефект IK каналів у діабеті є так само пригніченим, як і SK (165), однак інші статті наводять докази того, що експресія каналу IK суттєво зростає при діабеті (166). Вищезазначене вказує на те, що при діабеті 2 типу TRPV4 залежне сигналювання є пригніченим або за рахунок прямого впливу діабету на TRPV4, або на кальцій-залежні калієві канали.

Іншим елементом сигнальних шляхів судинної стінки, який зазнає змін при діабеті є EDHF. Багато досліджень стверджують, що його ефект у розслаблення при діабеті 2 типу зменшується або зовсім зникає. Потенційними причинами для цього вважають пригнічену експресію калієвих каналів вхідного випрямлення,  $K_{ATP}$  каналів, та кальцій-залежних калієвих каналів. Так було показано, що експресія SUR субодиниці  $K_{ATP}$  каналу, є зниженою в ГМК, а також аналогічні результати були показані для інших KIR каналів у різних судинах (167, 168). Інші дослідження показували, що при діабеті функція BK каналів може зменшуватися, але без змін у експресії самого каналу (169).

Для оксиду азоту, різні дослідження показують відмінні ефекти (особливо залежно від етапу розвитку діабету). Так більшість досліджень, у яких використовувалася модель діабету 2 типу та переддіабету вказують, що сигнальний шлях NO не зазнає

суттєвих змін, або навіть є підсиленими в якості компенсаторної функції. У той час як інші дослідження, в яких використовується модель діабету 1 типу, вказують на знижений ефект NO, на розслаблення судинної стінки через неспряженість NO синтази спричинену підвищеною продукцією активних форм кисню(167, 246, 247).

Ще одним з елементів, для якого дослідження вказують можливе підвищення його активності є ЦОГ. Так було показано, що експресія ЦОГ-2 у аорті діабетичних щурів була більшою, що вказує на розвиток патологічних запальних процесів, і вищу активність ЦОГ-залежного сигнального шляху (170). Водночас як, інші дослідження вказують, що при діабеті 2 типу (у мишей), спостерігається зниження експресії ЦОГ-1 (171).

Отже, регуляція ендотелійзалежного розслаблення аорти є комплексним явищем, що включає в себе значну кількість різних механізмів, які знаходяться в рівновазі в нормі та можуть зміщуватися в той чи інший бік у патологічних станах. Вивчення тонких механізмів підтримання цієї рівноваги та неортодоксальні ефекти PPAR на неї, можуть бути корисним для розуміння регуляції судинного тонуусу аорти в нормі та корекції неї за патологічних станів.

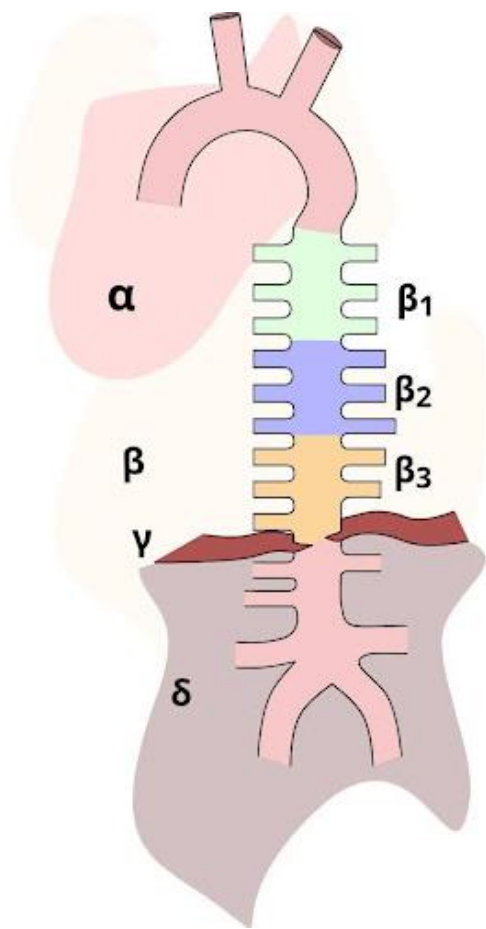
### 3 Матеріали та методи

#### 3.1 Тваринні експерименти

В експериментах були використані 3-місячні самці щури лінії Вістар, що були використані відповідно до Директивою ЄС 2010/63/EU для експериментів на тваринах. Експериментальний протокол отримав схвалення Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. Богомольця(ІБФ). Тварини утримувалися в спеціалізованому тваринницькому закладі (віварії) ІБФ, та були докладені всі можливі зусилля для мінімізації їх страждань.

Щурів, що важили 200–250г, евтаназували за допомогою поступового зростання парціального тиску CO<sub>2</sub> у камері, після чого проводили декапітацію.

Загалом у всіх експериментах було використано 93 щура. Під стереомікроскопічним контролем аорти обережно були відсічені від дуги аорти аж до ниркових артерій, з видаленням оточуючих жирових та сполучних тканин. 6 сегментів аорти довжиною приблизно  $0.14 \pm 0.1$  см кожен, були виділені відповідно до розташування міжреберних артеріальних гілок за допомогою окуляра з лінійкою сіткою, що дозволяв забезпечити постійні розміри. Сегменти були класифіковані на три групи: проксимальні сегменти грудної аорти, проміжні відділи грудної аорти й дистальні сегменти грудної аорти (Рис. 3.1.1).



**Рис. 3.1.1. Схематичне зображення аорти.**

(α) дуга аорти, (β) уся грудна аорта, з якої відходять міжреберні артерії, (β1) проксимальний відрізок грудної аорти, (β2) проміжний відрізок грудної аорти, (β3) дистальний відрізок грудної аорти, (γ) діафрагма, і (δ) черевна аорта. Проксимальний, проміжний та дистальний відрізки грудної аорти були розділені на кілька кілець довжиною 5 мм, які використовувалися для вимірювання їх розслаблення, спричиненого ацетилхоліном на фоні фенілефринової преко́нстрикції.

Реактиви використані в дослідженні гідрохлорид фенілефрину, хлорид ацетилхоліну, хлорид барію, октагідрат оубаїну, гідрохлорид нікардіпіну, 18α-гліцирретинова кислота, SIN-1, росіглітазон, GSK1016790A (GSK101), хлорид індометацину, капсаїцин, хлорид апаміну, хлорид тетраетиламонію (TEA), N-G-L аргінін, метиленовий синій, HC-067047 (HC) усі отримані від Sigma-Aldrich. Усі сполуки додавали безпосередньо з відповідних стокових розчинів до експериментального розчину Кребса для досягнення бажаних робочих концентрацій, які наведені в таблиці нижче (Таблиця 3.1.1)



**Таблиця 3.1.1. Робочі концентрації використаних речовин**

Речовина	Скорочена назва	Концентрація	Розчинність
Фенілефрин	PE	10 мкмоль/л	H <sub>2</sub> O
Ацетилхолін	Ach	1 мкмоль/л	H <sub>2</sub> O
BaCl <sub>2</sub>	Ba	100 мкмоль/л	H <sub>2</sub> O
Оубаїн	Оубаїн	40 мкмоль/л	H <sub>2</sub> O
Нікардипін	Нікардипін	1 мкмоль/л	ДМСО
18α-гліцирретинова кислота	18GA	10 мкмоль/л	ДМСО
Росіглітазон	Rosi	5 мкмоль/л	ДМСО
Індометацин	Indo	1 мкмоль/л	H <sub>2</sub> O
Капсаїцин	Caps	5 мкмоль/л	Етанол
Апамін	Апамін	0.1 мкмоль/л	5 % оцтова кислота
GSK1016790A	GSK101	1 мкмоль/л	ДМСО
НС-067047	НС	1 мкмоль/л	ДМСО
Нітро-G-L аргінін	NG-arg	100 мкмоль/л	H <sub>2</sub> O
Метиленовий синій	met blue	10 мкмоль/л	H <sub>2</sub> O

Контрольні експерименти підтвердили, що ДМСО та етанол у концентраціях до 0,1 % не впливали на скоротливість кілець аорти.

### 3.2 Тензометрія

Для реєстрації скорочень та розслаблення сегментів аорти їх підвішували в камері, через яку протікав розчином Кребса з постійною швидкістю в 6 мл на хвилину. Склад розчину Кребса був наступним 120 мілімоль/л  $\text{Na}^+$ , 5 мілімоль/л  $\text{K}^+$ , 2 мілімоль/л  $\text{Ca}^{+2}$ , 1,2 мілімоль/л  $\text{Mg}^{+2}$ , 5 мілімоль/л глюкози та 7 мілімоль/л  $\text{Hepes}$  (рН 7,35 при 37 С°). Гіперкалієвий розчин Кребса мав склад аналогічний вищенаведеному, з еквівалентною заміною 60 мілімоль/л  $\text{Na}^+$  на  $\text{K}^+$ . Кожен із сегментів був закріплений парами гачків із нержавіючої сталі — один гачок був закріплений на стінці експериментальної камери, а інший — був приєднаний до тензодатчику. Механічні реакції були виміряні в ізометричному режимі, та були квантифіковані за допомогою діджитайзера Ахон DigiData 1200 та відображалися на екрані комп'ютера за допомогою програмного забезпечення Clampex 8.0.

Перед початком вимірювань кільцям дозволяли пропрацювати в чистому розчині Кребса під базальною напругою в 1 мН протягом 1 години. Значення базальної напруги було розраховано за допомогою метод Мульвані шляхом розрахунків внутрішнього діаметру перерізу стінки судини, що були використані для визначення необхідного базального тиску щоби приблизно дорівнював 100 мм рт тиску в кров'яному руслі (172).

Необхідна базальна напруга була розрахована за формулою, де спочатку розраховували переріз судини знаючи розміри експериментальної установки (3.2.1):

$$L = (\pi + 2)d + 2s \quad (3.2.1)$$

Де  $L$  — це внутрішній переріз судини (мм),  $d$  — діаметр крючків (мм),  $s$  — відстань між крючками (мм). А наступним кроком розраховували необхідне базальне напруження судинної стінки за формулою (3.2.2):

$$T = \frac{F}{2g} \quad (3.2.2)$$

Де  $g$  — це довжина судини (мм),  $F$  — це тиск на судину на одиницю довжини перерізу (міліньютон/мм), а  $T$  це базальна напруга на судинній стінці (міліньютон/мм<sup>2</sup>).

Життєздатність сегментів перевіряли за допомогою фенілефринового скорочення та ацетилхолін-індукованого розслаблення на його тлі, де розслаблення в кільцях із непошкодженим ендотелієм було суттєво більшим, ніж у кільцях з ушкодженим. Субмаксимальне тонічне скорочення сегментів викликали застосуванням фенілефрину в концентрації 10 мкмоль/л, а субмаксимальне розслаблення викликали за допомогою 1 мкмоль/л ацетилхоліну, що викликав розслаблення на 90–100 %. Обидві концентрації були обрані на основі побудованих кривих доза-ефект.

### 3.3 Моделювання діабету 2 типу за допомогою Нікотинамід/Стрептозотоцин моделі

Для того, аби викликати діабет другого типу в експериментальних тварин використовували стрептозотин-нікотинамідну модель.

Щурам лінії Вістар віком три місяці та масою 250 г, внутрішньочеревно вводили 230 мг/кг нікотинамід, та через 15 хв вводили стрептозотин (СТЗ) у дозі 65 мг/кг, а тваринам із контрольної групи вводили той самий об'єм буферного розчину. Через 3 дні після введення СТЗ, були проведені виміри вмісту глюкози в крові експериментальних тварин заради того, щоб відсортувати тих, кого можна віднести до діабетичної групи за рівнем глюкози, та після 3 місяців тварини були використані в експериментальній роботі.

Відомо, що введення стрептозотину в комбінації з нікотинамідом, використовується в багатьох попередніх експериментальних роботах для індукування діабету в щурів за рахунок ушкодження  $\beta$ -клітин підшлункової залози стрептозотинном, у той час, як нікотинамід частково має захищати  $\beta$ -клітини від дії стрептозотину, задля збереження мінімального функціонування клітин підшлункової.

У дослідах зі щурами виявлено, що важкість діабету сильно залежить від дози стрептозотину та нікотинамід та їх співвідношення, яке застосовується для індукції діабету в цих тварин. У діабетичних щурів рівень глюкози в крові, може, коливатися від незначної гіперглікемії до значної гіперглікемії в порівнянні з контрольними щурами (173).

Для вимірювання концентрації глюкози був використаний портативний глюкометр Rightest (Bionime, Швейцарія). Кров для аналізу відбирали з хвостової артерії після голодування протягом 12 годин у контрольних і діабетичних щурів натщесерце, після чого тваринам перорально вводили розчин глюкози з розрахунку 2 мг/г ваги й потім через проміжки часу 15, 30, 60, 90 та 120 хвилин вимірювали

концентрацію глюкози в крові, для розрахунку кривої толерантності до глюкози. Для оцінки концентрації глюкози її розраховували, як площу під кривою залежності концентрації глюкози від часу (AUC). Графік був розбитий на дві частини, висхідну та низхідну, де для них використовувалися різні формули для обрахунку.

Розрахунки для висхідної частини графіку проводили за формулою (3.3.3):

$$AUC = 1/2 (C1 + C2) (t2 - t1) \quad (3.3.3)$$

А для низхідної частини графіку толерантності за формулою (3.3.4):

$$AUC = \frac{(C1 - C2)}{(\ln(C1) - \ln(C2)) * (t2 - t1)} \quad (3.3.4)$$

Відповідно до отриманих результатів проводили обрахунок відмінностей концентрацій глюкози в крові між контрольною і експериментальною групою тварин, і в подальших експериментах використовували, лише тварин, для яких була показана статистично значуще збільшення концентрації глюкози.

### 3.4 Біоінформатичний аналіз даних РНК секвенування

Для аналізу патернів експресії використовувався метод аналізу даних секвенування матричної РНК. Цей метод включає в себе, виділення матричної РНК із тканини, з подальшим використанням секвенуванням усіх наявних РНК. Перевага даного методу полягає в його простоті та доступі до всіх матричних РНК у досліджуваній тканині інтересу, однак він продукує значні об'єми даних, аналіз яких вимагає використання специфічних інструментів, а також є вразливим до наявності гетерогенних популяції клітин, що не дасть можливості розрізнити ці клітини між собою.

У цій роботі були використані публічно доступні дані з РНК секвенування з двох досліджень, що були агреговані та реаналізовані задля визначення прихованих патернів методами інтегративного аналізу (174), за рахунок дослідження диференційної експресії між регіонами аорти. Дані секвенування з грудної проксимальної ділянки аорти були отримані зі статті (175), а дані із черевної, дистальної ділянки аорти були отримані зі статті (176). Первинні дані були отримані з порталу Sequence Read Archive (SRA), що надає доступ до геномних даних у опублікованих роботах, задля подальшого повторного аналізу, або підтвердження отриманих результатів.

Для подальшого аналізу, даних першопочатково вони мали бути аналізовані з приводу якості секвенування, задля уникнення включення в аналіз неякісних результатів. Для цього було використане програмне забезпечення QC tester, що показує прийнятні значення для кожного зразку, що дозволило використати їх у подальшому аналізі.

Наступним кроком було вирівнювання секвенованих РНК відповідно до референсного геному щура, що дозволяє виділити конкретні гени, та обрахувати кількісні показники їх експресії в різних ділянках аорти, для цього було використане програмне забезпечення HISAT2 та htseq (177), а в якості референсного геному був використаний mRatBN7.2.

Вирівняні файли, були трансформовані в матриці експресії, де кожному з генів наявних у референсному геномі відповідає кількісне значення їх присутності в зразку РНК. Задля більш коректної репрезентації ці дані були нормалізовані, на глибину секвенування (кількість прочитань), а також на довжину гену, що дозволить уникнути похибки пов'язаної з недостатньою репрезентацією довгих матричних РНК, однак нормалізовані дані, були використані, лише для легшої репрезентації напів-сірих даних, у той час, як у подальшому аналізі були використанні ненормалізовані дані, що є вимогою для аналізу використаним методом DeSEQ2 (178), що дозволяє порівнювати частоти експресії генів, за рахунок використання припущення про негативну біноміальну модель випадкового розподілу прочитань, та його порівняння за допомогою відповідних тестів, з наявними експериментальними даними.

Після цього для наступного аналізу якості даних секвенування був використаний метод аналізу головних компонент (Principal Component Analysis) — матриці коваріації даних були спроектовані в ортогональні площини, що дозволили нанести їх на двомірний графік та визначити їх віддаленість один від одного.

### 3.4.1 Аналіз головних компонент

Аналіз головних компонент показав суттєву віддаленість, деяких зразків, їх випадіння із загальної тенденції, що в більшості випадків вказує на помилки в підготовці цих зразків, та відповідно заради більш точного аналізу, ці зразки були виключені з аналізу (Рис. 3.4.1.1).

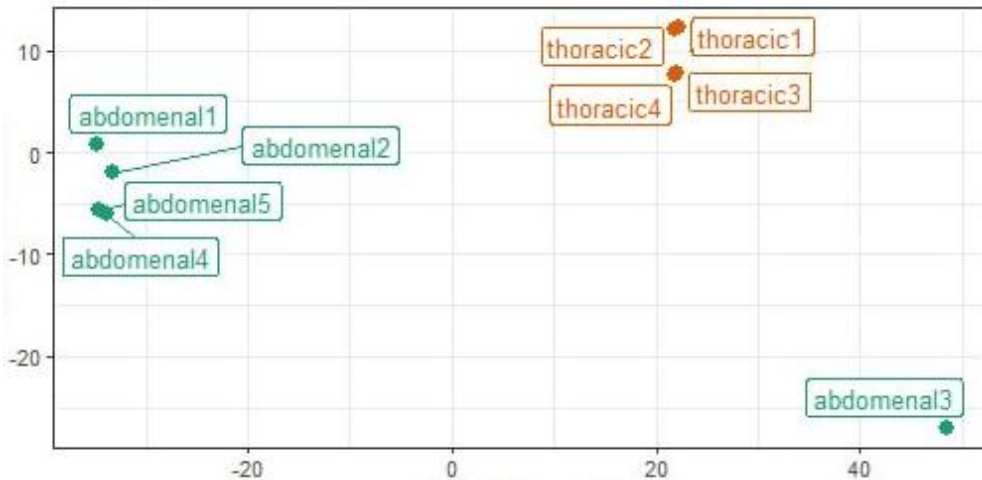


Рис. 3.4.1.1. PCA графік

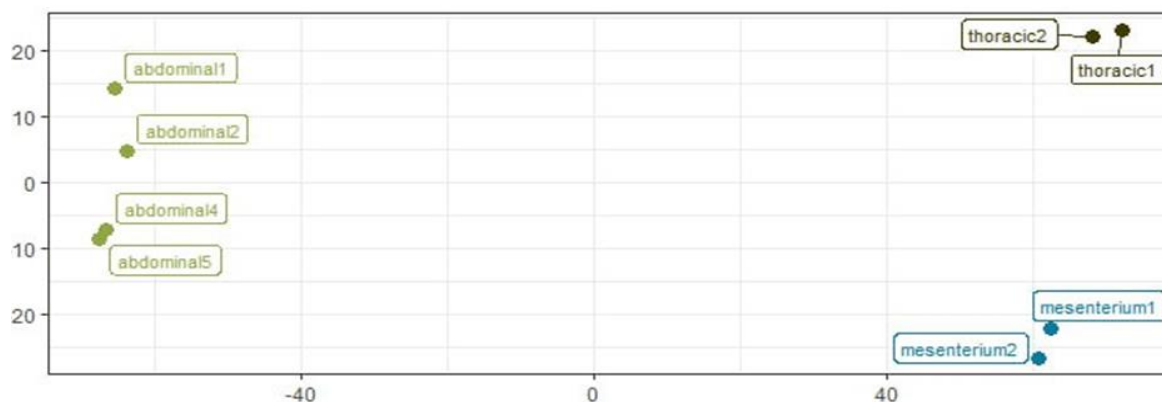
Показує схематичне зображення різних зразків у просторі двох головних компонент, Черевний зразок 3 суттєво відрізняється від усіх інших, через що він був видалений із подальшого аналізу.

Хоча аналіз даних РНК секвенування дає цінну інформацію щодо розуміння патернів диференційно експресії в експериментальних умовах, він чутливий до шуму, що виникає через різні фактори, наприклад, різні серії експериментів створюють так званий ефект групи. Враховуючи характер нашого аналізу, де ми використовуємо дані секвенування з двох різних статей, було складно впровадити корекцію ефекту групи та зменшити шум, який створюється шляхом збору даних із різних джерел. Проте задля його мінімізації був використаний метод рейрефікації (розрідження) (179) щоб вирівняти охоплення глибини між усіма зразками, та щоби пом'якшити шум, створений даними, зібраними з 2 різних джерел. Цей метод включає в себе ітеративне, випадкове, виключення спостережень із більшого зразку, аж поки його розмір не досягне розміру, меншого зразку. Хоча цей метод не здатний повністю, вирішити проблему агрегації даних із різних статей, він усе ж дозволяє зменшити значущість цієї проблеми.

Задля підтвердження робочої гіпотези, ми дослідили різницю між двома



аортальними локаціями та мезентеріальною судинною тканиною щура. Щоб оцінити цю різницю, ми застосували PCA. Наш аналіз показує, що різниця між усіма тканинами, як правило, є значною, і всі зразки тканини можна згрупувати разом за тканинними ярликами (Рис. 3.4.1.2.). Це частково підтверджує достовірність нашого аналізу.



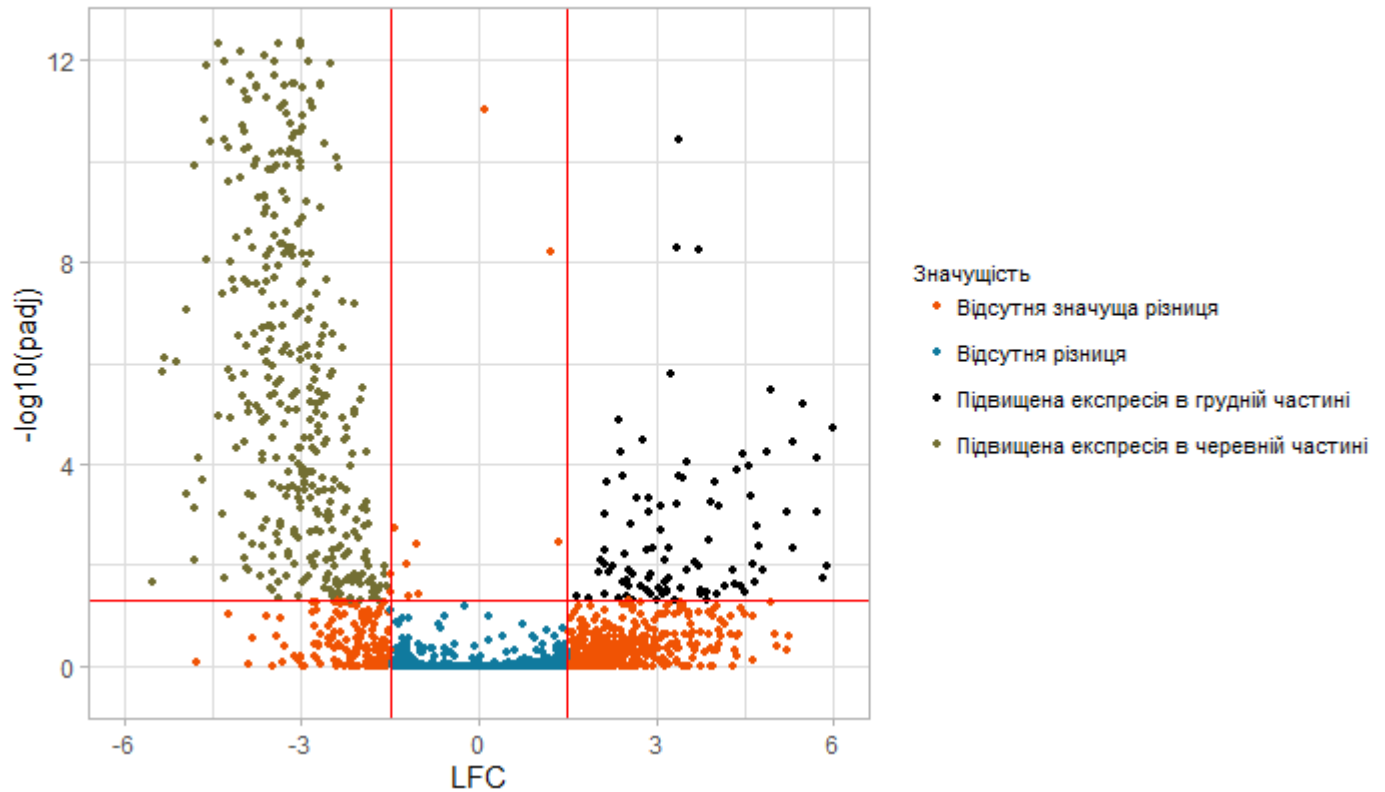
**Рис. 3.4.1.2. PCA графік.**

PCA графік із додатковими зразками з мезентеріальної тканини, що показують групування зразків за тканинними маркерами.

### 3.4.2 Аналіз диференційної експресії генів у різних ділянках аорти

На наступному етапі дослідження, ми використали нормалізовані та розріджені матриці експресії, для перевірки гіпотези на диференційну експресію між двома аортальними локаціями, використовуючи, DeSEQ2 де гени з низькою експресією (менше 10 прочитань у кожному зразку) були видалені оскільки вони були недостатньо репрезентовані в аналізованих зразках. Нормалізовані матриці прочитань використовувалися для побудови від'ємної біноміальної моделі, обчислення середнього значення та дисперсії та перевірки нульової гіпотези однакової експресії генів у грудній та черевній частині аорти за допомогою негативного біноміального тесту. Різниця в експресії та Р-значення цих різниць були обчислені за допомогою тесту співвідношення ймовірності (LRT) після чого вони були скориговані за методом Бенджаміні–Хохберга. Після чого р-значення та частота помилкових відкриттів (FDR) були розраховані для контролю вірогідностей помилки I типу. Після всієї фільтрації кількість диференціально експресованих генів між грудною та черевною аортою становила 497.

Гени, для яких була показана диференційна експресія були відфільтровані на основі критеріїв: лише гени з р-значенням  $\leq 0,05$  та  $> 1$ - кратним логарифмом кратності зміни між грудною та черевною аортою були збережені. Для візуальної репрезентації результатів аналізу був побудований вулканоподібний графік, що показав наявність значущого біологічного сигналу, що вказує на чіткий патерн диференційної експресії між двома аортальними відділами (Рис. 3.4.2.1.).

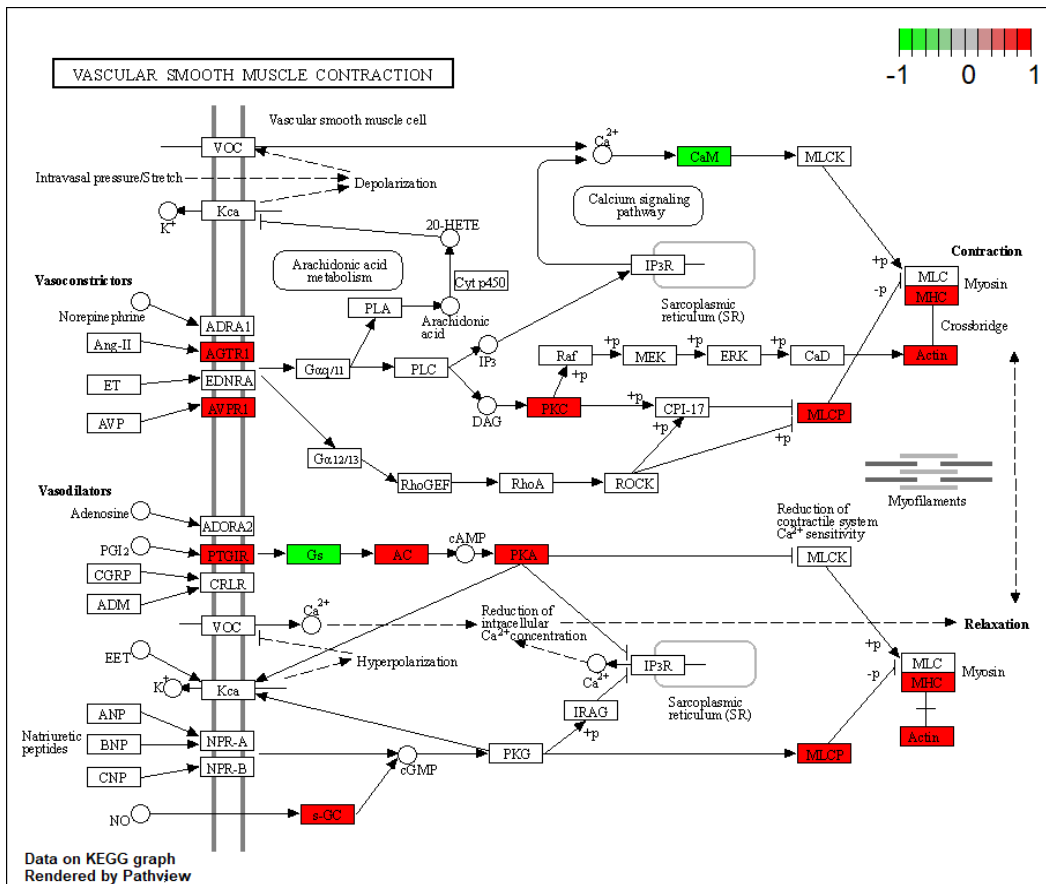


**Рис. 3.4.2.1. Вулканоподібний графік аналізу даних секвенування**

Відображає логарифм кратності зміни (LFC) для грудної частини аорти порівняно із черевною по осі X, та від’ємний десятковий логарифм від  $p$  значення по осі Y. Оранжеві точки позначають гени з підвищеною експресією, тоді як, сині точки вказують на гени зі зниженою експресією. Додатково, голубі й зелені крапки представляють гени з LFC менше 1 та значенням  $p$ -значення вище 0.05. Цей відмінний патерн експресії свідчить про наявність суттєвого біологічного сигналу між різними локаціями аорти, що підкреслює наявність диференційної експресії між двома локалізаціями.

Отримані матриці диференційно експресованих генів були аналізовані, вручну — переглянувши всі гени пов’язані із судинними функціями, а також з PPAR- $\gamma$ , а також використовуючи програмне забезпечення KEGG pathview (Рис. 3.4.2.2, 3.4.2.3.) (180).





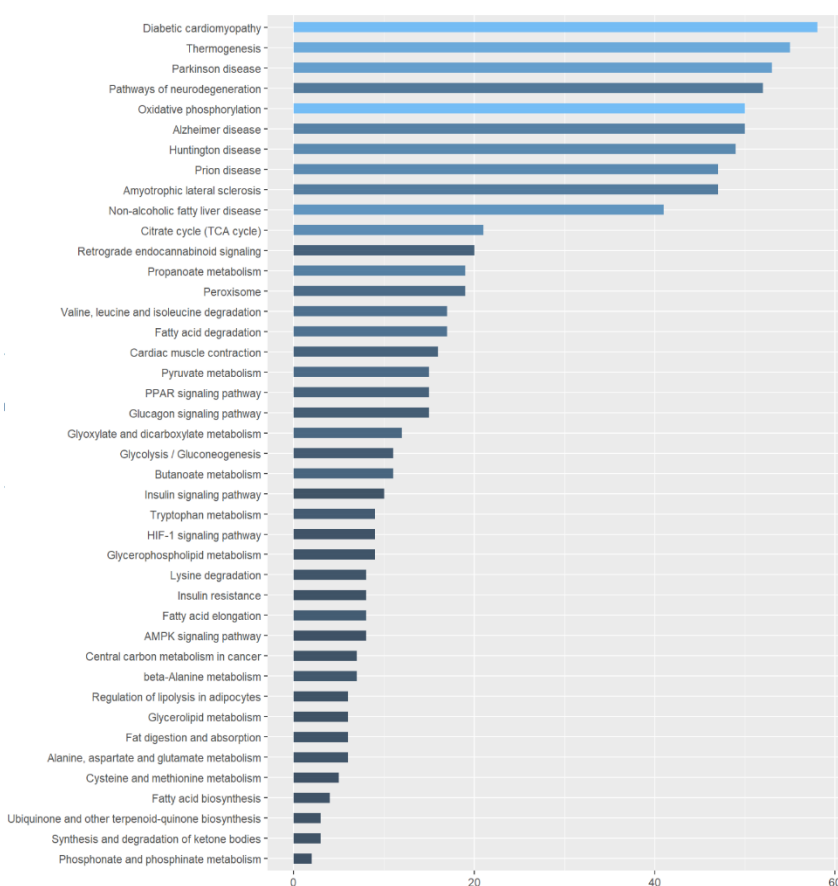
**Рис. 3.4.2.3. Схематичне зображення сигнальних шляхів пов'язаних зі скороченням та розслабленням гладенького м'язу.**

Зеленим кольором відмічені елементи надекспресованими в абдомінальній аорті, червоним ті, що є надекспресованими в грудній частині аорти, а білим ті, що не мають диференційної експресії між аортальними локаціями. Згенеровано за допомогою пакету KEGG Pathview.

Отримані дані свідчать про наявність диференційною експресії між проксимальною та дистальною частинами грудної аорти для таких генів як *kcnj14* (калієвий канал вхідного випрямлення 14 член родини J), *casna1d* (потенціалзалежний кальцієвий канал L типу), *TUBA1* (тубулін 1), *Actr1b* (актин-зв'язаний білок), *Myl6* (легкий ланцюг міозину 6), *Myo7b* (міозин 7β), *CaM1* (кальмодулін 1), а також *AGTR1* (рецептор ангіотензину 1), що є пов'язаними з реалізацією судинної функції. А також диференційну експресію таких генів як *PPAR-a*, та багатьох генів, що регулюються *PPAR* рецепторами такими, як *UCP1* (роз'єднувальний білок 1), *GlyK* (гліцеролкініза),

*FABP3* (білок, що зв'язує жирні кислоти), *cpt-1/2* (карнітин пальмоноацилтрансфераза), а також суб-значущу диференційну експресію гену *PPAR-γ*, що вказує на відмінності у функціонуванні різних ділянок аорти не тільки в рамках судинних, а також енергетичних функції.

Останнім етапом аналізу даних РНК секвенування була побудова графіку, що досліджував би не поодинокі гени, та їх диференційну експресію, а позитивну чи негативну регуляцію цілих сигнальних шляхів, на основі відомих нам літературних даних щодо залучення певних генів у різних сигнальних шляхах (Рис. 3.4.2.4.).



**Рис. 3.4.2.4. Графік насиченості різних сигнальних шляхів із бази даних Kegg Mouse 2019.**

Розміром стовпчика показана кількість диференційно експресованих генів, які належать до конкретного сигнального шляху, а насиченістю кольору вказано статистичну значущість для цих генів.

Отриманий графік свідчить, що в дистальній ділянці аорти, спостерігається позитивне регулювання генів пов'язаних із термогенезом, діабетичною патологією, енергетичним метаболізмом, а також сигнальним шляхом рецепторів *PPAR-γ*.

### 3.5 Метод молекулярного докінгу

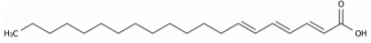
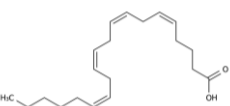
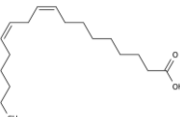
Задля дослідження особливостей корегулювання PPAR- $\gamma$  рецептора та TRPV4 каналу був використаний метод молекулярного докінгу, що дозволяє дослідити процес зв'язування лігандів із цими рецепторами та перевірити гіпотезу про потенційне неспецифічне крос-активування цих рецепторів.

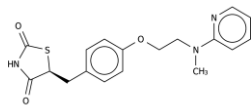
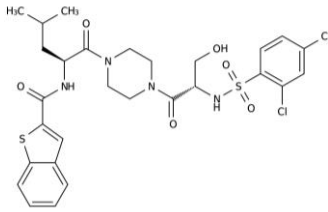
У ході роботи було використане програмне забезпечення AutoDock 4 (Scripps Research, USA) (181)— для безпосередньо молекулярного докінгу, Avogadro (Avogadro Chemistry, USA) (182)— задля підготовки та оптимізації структури ліганду, Chimera X (RBVI, USA) (183) — задля підготовки та оптимізації структури рецептору.

Для аналізу були обрані наступні ліганди: відомі речовини, для яких показана здатність зв'язуватися з TRPV4 каналом та PPAR- $\gamma$  рецепторами, та речовини-обманки (184), щодо яких точно відома їх нездатність взаємодіяти з даними рецепторами задля, підтвердження валідності результатів докінгу, у вигляді калібрування по двом точкам (Таблиця 3.5.1).

**Таблиця 3.5.1.**

**Список лігандів, використаних для аналізу методом молекулярного докінгу.**

	Формула у форматі SMILES	Графічна репрезентація	Спорідненість
Ейкозотрієнова кислота	<chem>CCC=CCC=CCC=CCCCCCCCC(=O)O</chem>		Відомий активатор PPAR- $\gamma$ та TRPV4
Арахідонова кислота	<chem>CCCC/C=C\C/C=C\C/C=C\C/C=C\C/C=C\CCCC(=O)O</chem>		Відомий активатор TRPV4
Лінолева кислота	<chem>CCCCC=CCC=CCCCCCCC(=O)O</chem>		Відомий активатор PPAR- $\gamma$

	Формула у форматі SMILES	Графічна репрезентація	Спорідненість
Росіглітазон	<chem>CCN(CC)C1=CC2=C(C=C1)N=C3C4=CC=CC=C4C(=O)C=C3O2</chem>		Відомий активатор PPAR-γ
GSK101	<chem>CC(C)C[C@H](NC(C1=C2=CC=CC=C2S1)=O)C(N3CCN(CC3)C([C@H](CO)NS(=O)(C4=C(Cl)C=C(Cl)C=C4)=O)=O)=O</chem>		Специфічний активатор TRPV4

Для аналізу схожості молекул взятих у аналіз був використаний метод аналізу молекулярних хімічних відбитків, за допомогою програмного пакету RDkit (185). Спершу молекулярна формула в ізометричному форматі SMILES (186) була трансформована в молекулярний відбиток, що дозволив квантифікувати хімічні характеристики молекули, включаю, розміри, геометрію, заряди загальні й поверхневі, та здатність до обертання. Використовуючи ці дані був розрахований коефіцієнт подібності Танімото для всіх пар молекул, що дозволило оцінити їх подібність, та потенціал до крос-взаємодій (187).

Серед рецепторів для аналізу були обрані наступні молекули: TRPV4, PPAR-γ, TRAAK, TWIK, Kv3.2, Kv1.2, CaV1.2, SK, та гуанілатциклаза (Таблиця 3.5.2). Ці рецептори були обрані через те, що з літературних даних відомо, про їх зв'язок із регулюванням функції судин, а також про їх потенційне спільне залучення в деяких сигнальних шляхах у судинній стінці.



Таблиця 3.5.2

**Список йонних каналів обраних для аналізу методом молекулярного докінгу.**

Білок обраний для аналізу	Функція в аорті	PDB код білку	Експресія в аорті
PPAR- $\gamma$	Енергетичний метаболізм	2ZNO	Ендотелій (188) ГМК (189)
TRPV4	Термочутливість, механочутливість, регулювання судинної функції	6BBJ	Ендотелій (190), ГМК (191)
TRAAK	Механочутливість, регулювання судинної функції	6PIS	Ендотелій (192) ГМК (193)
TWIK	Механочутливість, регулювання судинної функції	3ZS1	Ендотелій (192) ГМК (194)
Kv3.1	Регулювання судинної функції, розслаблення гладенького м'язу	7PQU	Ендотелій (52) ГМК (195)
Kv1.2	Розслаблення гладенького м'язу	3LUT	Ендотелій (68), ГМК (196)
CaV1.2	Скорочення гладенького м'язу	8WE6	ГМК (197)
SK	Регулювання судинної функції, розслаблення гладенького м'язу	6CNO	Ендотелій (198)
sGC	Розчинна гуанілатциклаза, NO-залежне розслаблення	6JT2	Ендотелій (199), ГМК (200)

Молекулярна структура рецепторів були отримана з порталу ProteinDataBank, а тривимірні структури лігандів, були завантажені з порталу PubChem. Першим етапом роботи була підготовка структури ліганду до докінгу, що включала в себе оптимізацію його тривимірної структури в програмному середовищі Avogadro, за

допомогою розрахунку силових полів молекули, та відповідної корекції кутів молекулярних зв'язків упродовж 1000 ітерацій.

Наступний етапом була підготовка молекули рецептора в програмному середовищі CHimera X, що включала видалення всіх неортодоксальних залишків, що могли бути лігандами зв'язаними з білком, або молекулами води, а також додаванням заряду за рахунок розрахунку заряду білків методом Кольмана, і додавання полярних залишків до структури білку.

Наступним етапом були виконання пошуку всім можливих сайтів зв'язування між лігандом та білком, у програмному середовищі AutoDock4. Задля цього були заздалегідь побудовані силові поля рецептора та ліганду, та обрана ділянка для пошуку на молекулі рецептора. Оскільки в межах цього дослідження ми не мали апріорного знання про потенційні сайти зв'язування на наших рецепторах, ми використали метод сліпого докінгу, у якому до уваги береться вся молекула рецептору, а не, лише певні частини.

Використовуючи отриману в ході пошуку інформацію про сайти зв'язування був проведений молекулярний докінг у програмному середовищі AutoDock4, використовуючи ламарківський генетичний алгоритм, з 100 кроків, та 200000- епох для кожного кроку, упродовж яких алгоритм намагався зістикувати молекулу ліганду до потенційних сайтів зв'язування молекули рецептора, на основі силових полів та зарядів молекул, розраховуючи також вільну енергії зв'язування, та константу інгібування, які були використані для оцінки якості взаємодії білку та ліганду. Константа інгібування розраховувалася за рівнянням з енергії зв'язування.

$$(3.5.1) \quad K_i = \exp\left(\frac{G}{RT}\right) \quad 3.5.1$$

Де  $K_i$  — константа інгібування,  $T$  — температура,  $G$  — енергія зв'язування,  $R$  — газова стала.

Наступним етапом, був аналізований результат докінгу, з візуалізацією найкращих конформацій білку та ліганду, задля визначення потенційного ефекту

взаємодії, враховуючи який саме домен білку був задіяний у цьому процесі. Та визначаючи домен, у якому відбулося зв'язування порівнюючи його з літературними відомостями та визначали амінокислоту білку, які входять у прямиий контакт та відповідають за зв'язування ліганду.

### 3.6 Статистичний аналіз

Для статистичного аналізу отриманих даних використовувалося наступне програмне забезпечення: ClampFit 8 (201), та R 4.3 (202). Для аналізу тензометричних даних першопочатково, записи були оброблені у ClampFit звідки були квантифіковані, та завантаженні в програмне середовище R.

Для аналізу тензометричних даних первинні числові значення були перераховані в нормалізовану амплітуду за рахунок наступної формули, аби виключити ефект зміни базального тону на амплітуди розслаблення (3.6.1).

$$\text{Нормалізована амплітуда} = \frac{(\text{максимум скорочення} - \text{мінімум розслаблення})}{\text{базальний тонус}} \quad (3.6.1)$$

Для того щоби проілюструвати, відносний внесок компоненту в розслаблення судини, нормалізований відсотки зменшення були розраховані з нормалізованої амплітуди, беручи контрольне розслаблення за 100, за наступною формулою (3.6.2).

$$\text{Відсоток зменшення} = \frac{\text{Нормалізована амплітуда після аплікації речовини}}{\text{Нормалізована амплітуда в контроль}} \times 100 \quad (3.6.2)$$

Для порівняння базального тону судини він був нормалізований за наступною формулою (3.6.3):

$$\text{Нормалізований базальний тонус} = \frac{\text{Базальний тонус у певний момент}}{\text{Початковий базальний тонус}} \quad (3.6.3)$$

Для перевірки статистичної значущості у відмінностях між контрольними та дослідними групами, у випадку 2 груп був використаний Т-тест Велча, через його невразливість до різниці у варіації, розмірах вибірки(203). У випадку, коли потрібно було перевірити відмінності більш ніж, між 2 групами, був використаний аналіз варіації в модифікації Велча (Welch Anova) з поправкою Холма, що також є робастним до різниці у варіації, розмірах вибірки, та ненормальності розподілу (204). Для post-hoc аналізу, був використаний тест Тьюкі, задля визначення сили та напрямку відмінностей (205).

Також у ході аналізу був використаний тест Колмогорова-Смірнова задля перевірки характеру розподілу(206).

Також для пошуку прихованих змінних, що впливають на варіацію в спостереженнях був використаний нечіткий факторний аналіз, у програмному середовищі R, який дозволяє визначити наявність прихованих факторних змінних здатних пояснити патерни поведінки даних.

Статистично значущим вважався рівень у 95 % ( $p < 0.05$ ), а числові значення в роботі представлені у вигляді середнього відсоткового зменшення  $\pm$  стандартне відхилення, а також у вигляді середньої нормалізованої амплітуди  $\pm$  стандартне відхилення.

Експериментальна вибірка тварин були розрахована, використовуючи метод аналізу статистичної сили, що був необхідним для визначення мінімальної кількості тварин, що мають бути задіяні в експерименті (207). Цей метод включає емпіричний підбір значення сили ефекту, який було проведено за допомогою попередніх експериментів, та дозволяє встановити мінімальні кількості тварин для кожної експериментальної групи в кількості 6 (за умови використання більш ніж, одного аортального сегменту для кожної тварини), при статистичній значущості у 0.95, та статистичній силі у 0.8, однак це значення в подальшій роботі були збільшено через неочікувані індивідуальні реакції тварин.

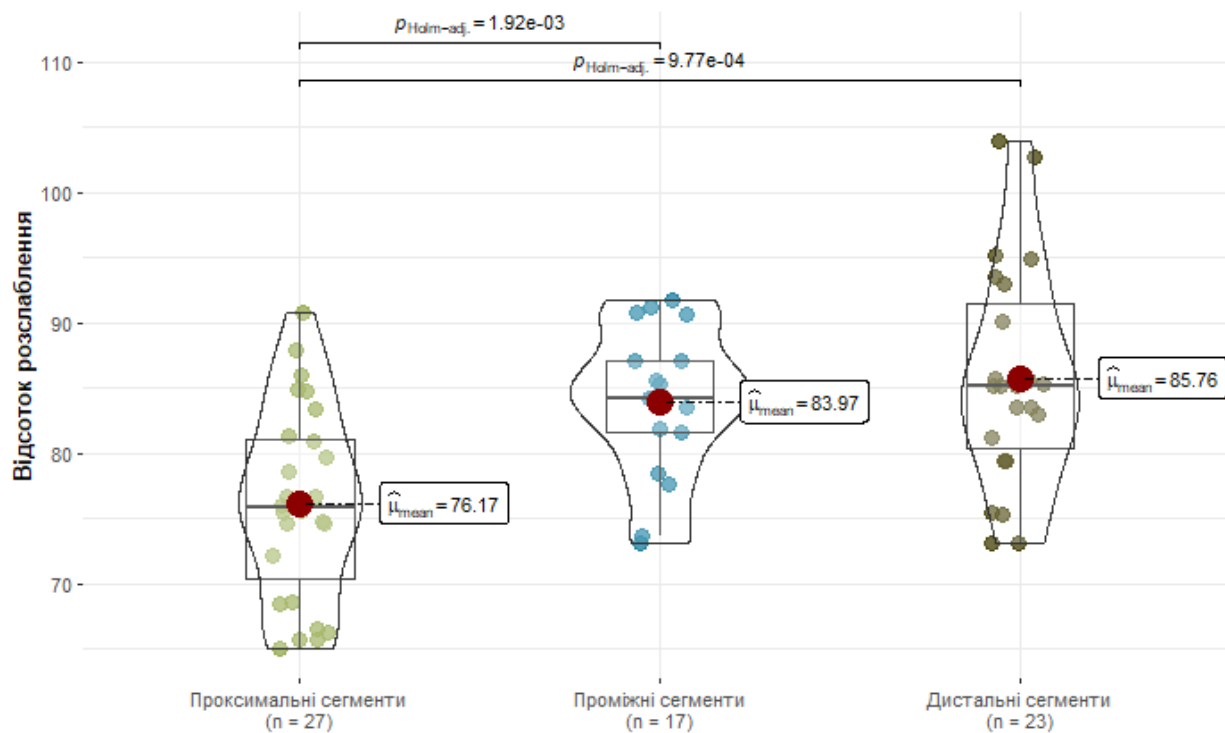
Графічні результати були представлені у вигляді скрипчасто коробчастих графіків, що зображають середнє, медіану, 1–4 квантиль, а також щільність розподілу в межах квантилів, разом із результатами статистичних тестів (208).

## 4 Результати та обговорення

### 4.1 Диференційна експресія кальцієвих каналів вхідного випрямлення, кальцієвих каналів, генів м'язового комплексу та ацетилхолінових рецепторів у грудній або черевній аорті

У ході попередніх експериментів була помічена гетерогоність у відповідях між різними експериментальними записами, яка зменшувала статистичну достовірність результатів. Відповідно до спостережень була висунута гіпотеза, що ця гетерогенність, може, бути пояснення диференційними функціональними особливостями в різних ділянках аорти, у першу чергу різницею між проксимальним та дистальним відділом грудної аорти. Задля перевірки цієї гіпотези був проведений аналіз диференційної експресії генів у цих ділянках — визначення відмінностей у транскриптомі проксимальної та дистальної частини аорти.

Першопочатково, для підтвердження нашої гіпотези ми дослідили різницю між проксимальним і дистальним сегментами грудної аорти на рівні ацетилхолін-індукованого розслаблення на тлі фенілефрин-індукованої прекоonstrікції. Аналіз амплітуд ацетилхолін-індукованого розслаблення в різних сегментах аорти показав наявність статистично значущих відмінностей між сегментами ( $F_{(Welch)}=11.43$ ,  $p=1.14e^{-4}$ ,  $n=67$ ) (Рис. 4.1.1), де проксимальні сегменти розслаблялися гірше за дистальні.



**Рис. 4.1.1. Порівняння ацетилхолін-індукованої релаксації на фоні фенілефрин-індукованої прекоonstrикції між ділянками грудної аорти.**

Для порівняння амплітуди ацетилхолін-індукованого розслаблення на тлі фенілефрин-індукованої прекоonstrикції між різними ділянками грудної аорти проксимальні, проміжні й дистальні сегменти були досліджені попарно. Між проксимальним, проміжним і дистальним сегментами спостерігається чітка статистична різниця ( $F_{\text{(Welch)}}=11.43$ ,  $p=1.14e^{-4}$ ,  $n=67$ ).

Хоча точні причини цих відмінностей не є описаними в літературі, існують певні дослідження, що пов'язують це з наступними чинниками: нерівномірна експресія певних іонних каналів, рецепторів і структурних білків, щільність та площа перерізу судинної стінки, а також різні популяції клітин у судинній стінці.

Для перевірки цієї гіпотези ми провели інтегративний аналіз даних РНК-секвенування грудної та черевної аорти з відкритих джерел. Цей аналіз мав на меті визначити гени, які, ймовірно, пов'язані із відмінностями в амплітудах ацетилхолін-індукованого розслаблення, що були виявлені в нашому дослідженні, виділяючи

потенційні молекулярні механізми, що лежать в основі функціональних відмінностей вздовж довжини грудної аорти.



### 4.1.1 Результати аналіз РНК-секвенування

Результати, показали значно відмінний патерн експресії між грудною та черевною аортою — загальна кількість диференційно експресованих генів складала 497. Серед цих генів, є кілька кандидатів, які, ймовірно, пов'язані із відмінностями в амплітудах ацетилхолін-індукованого розслаблення в різних сегментах аорти. Для відбору найбільш перспективних кандидатів ми вручну переглянули список усіх диференційовано експресованих генів і відібрали ті, які, як, відомо з літературних даних, пов'язані з ендотелійзалежним розслабленням або зі скороченням гладеньких м'язів судин — переважно йонні канали й білки компонентів м'язового комплексу. До таких кандидатів належать *Kcnj14*, *Cacna1*, *TUBA1*, *Arpc1b*, *Myl6*, *Myo7b*.

*Kcnj14* — калієвий канал вхідного випрямлення, пов'язаний з EDHF-індукованим розслабленням, та демонструє вищу експресію в черевній аорті порівняно з грудним відділом (LFC= -2.608389,  $p_{adj}= 5.829453e-15$ ).

*Cacna1d*, це субодиниця потенціал-залежних кальцієвих каналів альфа 1 D, також демонструє підвищену експресію в черевній аорті (LFC= -3,010768,  $p_{adj}= 4,212383e-13$ ). Це свідчить про його потенційну роль у впливі на нерівномірну скоротливу поведінку сегментів аорти.

*Tubal1*, альфа-субодиниця тубуліну, безпосередньо пов'язана з функціями щілинних з'єднань та демонструє вищу експресію в черевній аорті. Ця підвищена експресія, може, сприяти збільшенню щільності щілинних з'єднань у черевній ділянці (LFC= -3.581549,  $p_{adj}= 1.476636e-10$ ).

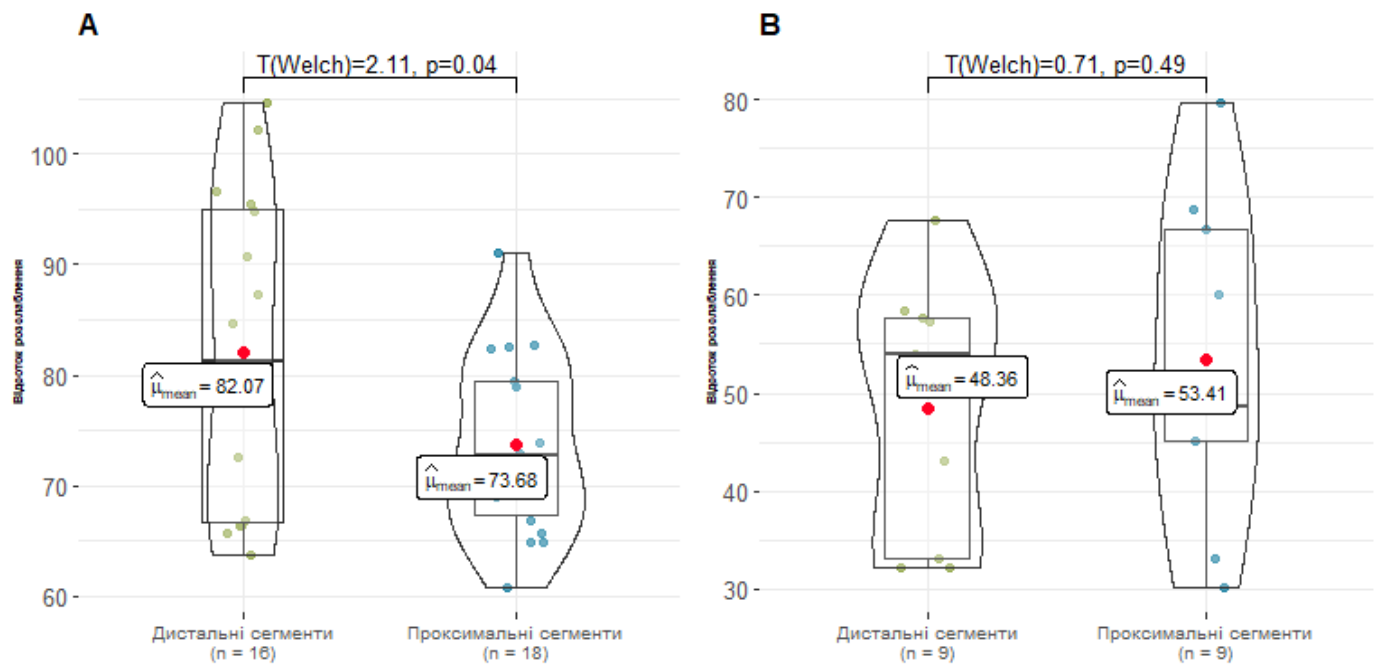
*Gucy1a1/ Gucy1b1* — альфа та бета субодиниці розчинної гуанілатциклази, що активується NO та напрацьовує цГМФ, який здатний за рахунок активації протеїнкінази G викликає розслаблення ГМК. Аналіз показав субзначуще збільшення експресії гуанілатциклази в дистальних частинах грудної аорти (LFC=-1,08897867,  $p_{adj}=6,473e-02$ ).

Нарешті, більш висока експресія *Myl6* (LFC= -3,014067,  $p_{\text{adj}}= 5,661287\text{e-}04$ ), легкого ланцюга міозину, *Myo7b* — міозину VIIb (LFC= -3,966135,  $p_{\text{adj}}= 2,669698\text{e-}11$ ), *Arpc1b* (LFC= -2.725473,  $p_{\text{adj}}=0.00574$ ) — актин-пов'язаного білку, у черевній частині аорти, може, потенційно пояснити спостереженні відмінності в амплітудах ацетилхолін-індукованого розслаблення.

Проаналізувавши результати РНК-секвенування, було сформульовано гіпотезу, що диференційна експресія генів *Kcnj14* (KIR) та *Cacna1* (потенціалзалежний кальцієвий канал), може, пояснювати варіації амплітуди. Для перевірки цієї гіпотези ми провели серію експериментів із вимірювання ацетилхолін-індукованого розслаблення аорти на тлі фенілефрин-індукованого скорочення на фоні селективного блокування KIR та потенціалзалежних кальцієвих каналів.

#### **4.1.2 Використання методу тензометрії для визначення відмінностей у функціонуванні різних ділянок аорти.**

Для пригнічення активності KIR-каналів, що присутні на мембрані ГМК, ми використовували суміш  $\text{Ba}^{2+}$  та оубаїну (100 мкмоль та 40 мкмоль, відповідно), щоби повністю заблокувати калієві струми через KIR. Отримані результати свідчать, що: після преаплікації  $\text{Ba}^{2+}$  та оубаїну протягом 20 хвилин відмінності у відсотку ацетилхолін-індукованого розслаблення між проксимальним та дистальним сегментами аорти, що спостерігалися раніше, зникли ( $t_{\text{(welch)}} = -0.71$ ,  $p=0.49$ ). На противагу цьому, контрольні вимірювання без блокування каналів показали, що різниця в амплітуді не змінювалася (Рис. 4.1.2). Цей результат частково підтверджує нашу гіпотезу, припускаючи, що диференційна експресія KIR дійсно відіграє важливу роль у відмінностях у відсотках ацетилхолін-індукованого розслаблення між різними сегментами аорти через їх вплив на EDHF-залежне розслаблення.



**Рис. 4.1.2. Порівняння амплітуд ацетилхолін-індукованого розслаблення в контролі та після блокади KIR.**

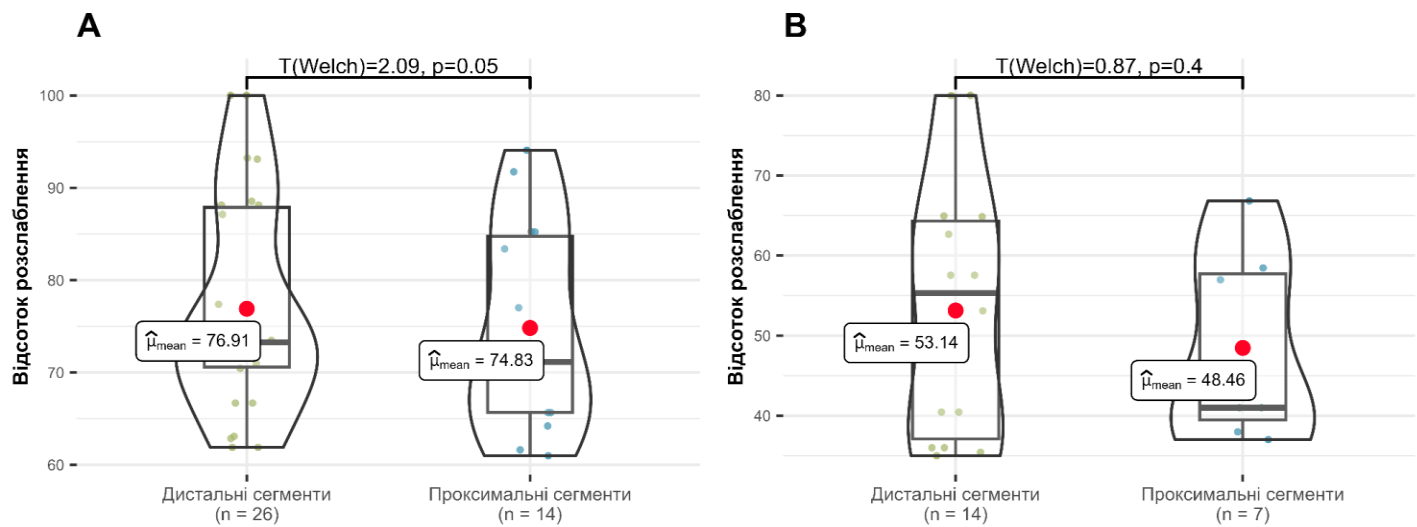
(А) Помітні відмінності у відсотках ацетилхолін-індукованого розслаблення між проксимальними й дистальними сегментами. Різниця є статистично значущою ( $t_{(\text{welch})}=2.11$ ,  $p=0.04$ ,  $n=34$ ). (Б) Після застосування  $100 \mu\text{M Ba}^{2+}$  і  $40 \mu\text{M}$  оубаїну різниця у відсотках ацетилхолін-індукованого розслаблення між проксимальними й дистальними сегментами зникає ( $t_{(\text{welch})}= 2.11$ ,  $p=0.04$ ,  $n=18$ ), що вказує на те, що інгібування KIR-каналів пригнічує розслаблення в сегментах аорти, з більш значним впливом на дистальну частину грудної аорти, що свідчить про більшу участь KIR-каналів у регуляції дистальних регіонів.

Це дозволяє припустити, що варіація в щільності KIR-каналів, може, бути причиною відмінностей в амплітудах ацетилхолін-індукованого розслаблення, що були побачені.

Щоб дослідити, чи, може, різниця в щільності міоендотеліальних контактів бути зумовлена диференційною експресією тубуліну, пояснити відмінності в амплітудах ацетилхолін-індукованого розслаблення, що були помічені, ми провели експеримент, використовуючи 18GA (протягом 30 хвилин), як блокатор щілинних контактів. Це мало

б послабити поширення EDHF через щілинні контакти, залишивши активним, лише трансмембранний калієвий компонент EDHF.

Також наші результати показали, що після застосування 18GA зникла незначна різниця у відсотках ацетилхолін-індукованого розслаблення між проксимальним і дистальним грудними сегментами аорти (Рис. 4.1.3) ( $t_{(welch)} = 0.87, p = 0.4, n = 14$ ), у той час як, у контрольних записах усе ще спостерігалася незначна різниця у відсотку розслаблення ( $t_{(welch)} = 2.09, p = 0.05, n = 14$ ). Це свідчить про те, що щілинні з'єднання, модульовані експресією тубуліну, можливо, відіграють певну роль у поясненні побачених відмінностей у поведінці грудної та черевної аорти.



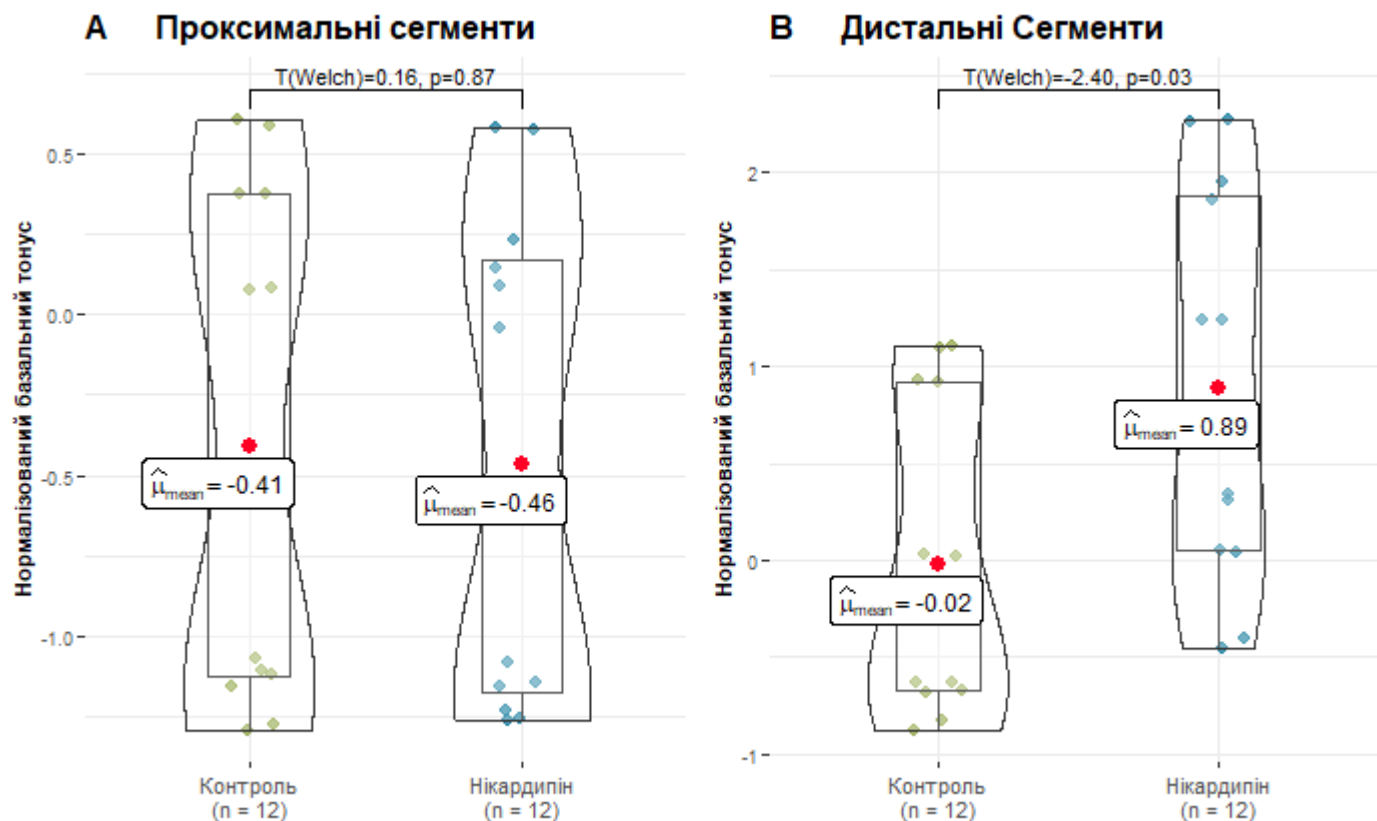
**Рис. 4.1.3. Різниця в ацетилхолін-індукованому розслабленні до й після використання 18 $\alpha$ -гліцирретинової кислоти в проксимальних і дистальних сегментах грудної аорти.**

(А) Різниця в ацетилхолін-індукованих розслабленнях між проксимальними й дистальними сегментами очевидна, причому відмінності статистично незначущі ( $t_{(welch)} = 2.09$ ,  $p = 0.05$ ,  $n = 40$ ). Помітно, що дистальні сегменти демонструють вищі значення. (Б) Після застосування 10 мкмоль 18GA різниця в ацетилхолін-індукованих розслабленнях між проксимальними й дистальними сегментами зменшується ( $t_{(welch)} = 0.87$ ,  $p = 0.4$ ,  $n = 21$ ), причому в дистальних сегментах спостерігається більш значне пригнічення розслаблення. Це явище, може, бути пов'язане з важливою роллю щільних контактів у поширенні EDHF.

Це свідчить про те, що варіація щільності експресії щільних контактів також відіграє важливу роль у відмінностях в ацетилхолін-індукованому розслабленні через зв'язок щільних контактів із поширенням EDHF у судинній стінці.

Для перевірки гіпотези про ефект кальцієвих каналів на відмінності в ацетилхолін-індукованому розслабленні була досліджена потенційна кореляція між експресією *Casnal* та амплітудами розслаблення. Для цього ми використовували нікардипін, селективний блокатор потенціал-залежних кальцієвих каналів, для інгібування цих каналів.

Незважаючи, на те, що ми не спостерігали помітних відмінностей у відсотках ацетилхолін-індукованого розслаблення між сегментами після аплікації нікардипіну, додатковий аналіз показав, що в кожному експерименті після використання нікардипіну протягом 20 хвилин спостерігалось помітне зниження базального тонусу дистальних сегментів ( $t_{(welch)} = -2.40$ ,  $p=0.03$ ,  $n=24$ ) (Рис. 4.1.4). Водночас, у проксимальних сегментах не спостерігалось значного зниження судинного тонусу ( $t_{(welch)}=0.16$ ,  $p=0.87$ ,  $n=24$ ). Отже, було зроблене припущення, що відмінності в експресії *Caspa1* не пояснюють спостережувані відмінності в ацетилхолін-індукованому розслабленні. Швидше за все, його диференційні експресія сприяє неоднаковій поведінці в проксимальному й дистальному відділах грудної аорти в рамках регуляції базального тонусу через більшу кількість ГМК у нижньому відділі аорти. Це свідчить про те, що потенціалзалежні кальцієві канали, ймовірно, відіграють більш важливу роль у дистальних сегментах порівняно з їх впливом у проксимальних сегментах.



**Рис. 4.1.4. Вплив потенціалзалежних кальцієвих каналів на базальний тонус кілець аорти.**

Порівняння нормалізованого базального тону (дивись ст. 65) до й після застосування нікардипіну (1 мкМоль) у проксимальному А) і дистальному (Б) сегментах виявляє статистично значущу в дистальних сегментах ( $t_{\text{welch}} = -2.40$ ,  $p = 0.03$ ,  $n = 24$ ), тоді, як, у проксимальних сегментах достовірна різниця відсутня ( $t_{\text{welch}} = 0.16$ ,  $p = 0.87$ ,  $n = 24$ ).

Отримані результати були використані в подальших дослідженнях для мінімізації варіації, та відбору найбільш репрезентативних ділянок грудної аорти для тензометричних експериментів.

Результати опубліковані в **Mezhenskyi OR, Philippov IB**. The difference in endothelium-dependent relaxation components in proximal and distal thoracic aorta regions of male rats. *Physiol Rep* 12: e15992, 2024. doi: 10.14814/PHY2.15992.

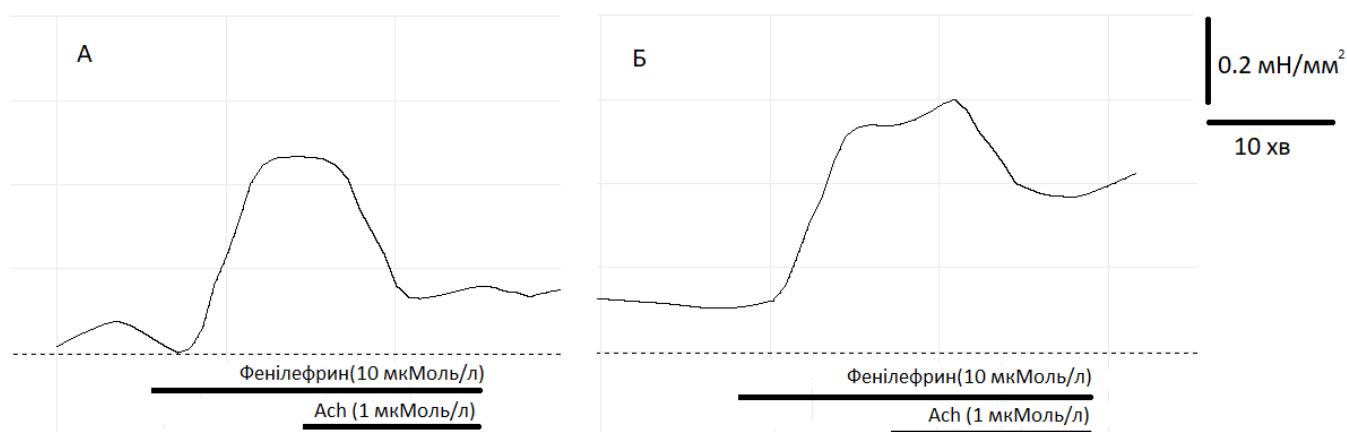


## **4.2 Внески компонентів ацетилхолін-індукованого розслаблення в нормі**

Першим етапом нашої роботи було встановити, який ефект мають класичні компоненти ацетилхолін-індукованого розслаблення в аорті, за нормальних умов, задля того, аби пізніше порівняти їх із діабетом, та визначити дію росіглітазону на них. Задля цього було проведено ретельне дослідження кількісного внеску EDHF (а саме його KIR-залежної компоненти), NO, ЦОГ -1/2, TRPV4 методом тензометричного вимірювання скорочення судинних препаратів аорти. Також був досліджений вплив сенсорної іннервації судини на ендотелійзалежні реакції.

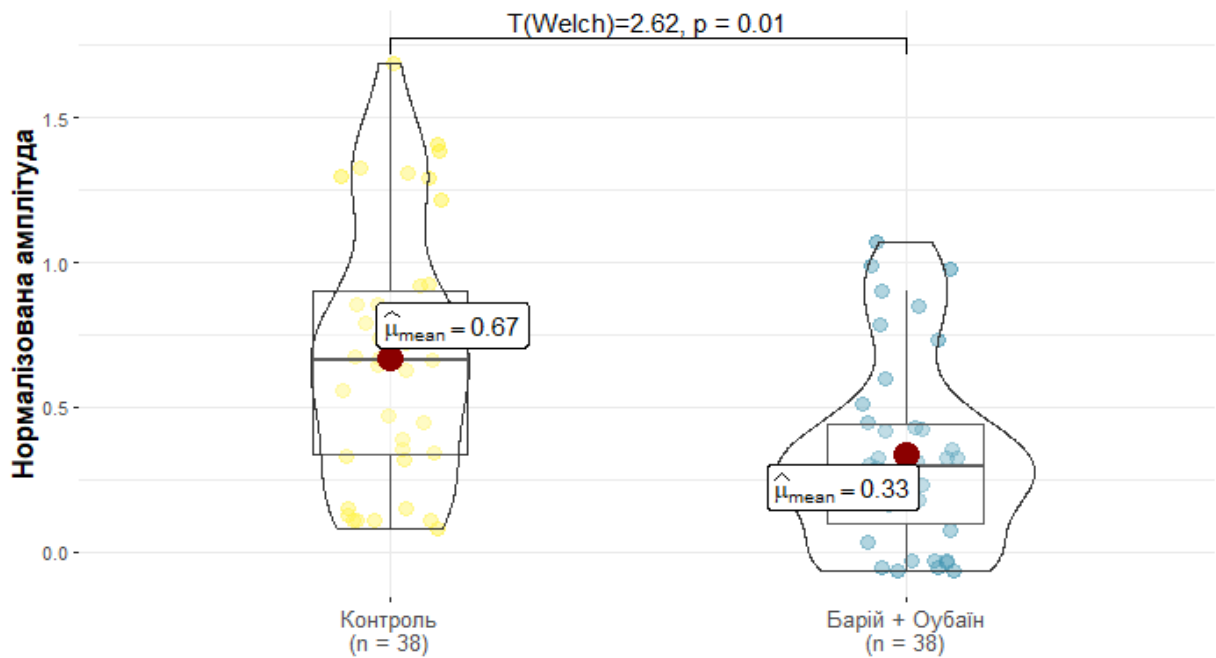
#### 4.2.1 Роль KIR-каналів в ацетилхолін-індукованому розслабленні

Наші результати показують, що після 20-хвилинної попередньої аплікації суміші з  $\text{Ba}^{2+}$  та оубаїну амплітуда ацетилхолін-індукованого розслаблення в умовах попереднього скорочення фенілефрином зменшувалася на  $50\% \pm 8\%$  ( $n=38$ ) порівняно з контрольним розслабленням (Рис. 4.2.1.1, Рис. 4.2.1.2). Це свідчить про значну участь KIR-каналів у регуляції функції ГМК аорти, на яку припадає близько 50% ацетилхолін-індукованого розслаблення.



**Рис. 4.2.1.1. Запис експерименту з порівнянням амплітуди розслаблення в контролі та після блокування KIR каналів.**

На А – ацетилхолінове розслаблення в контролі; На Б – ацетилхолінове розслаблення на 20-й хв. дії блокування KIR каналів за допомогою  $\text{Ba}^{2+}$  та оубаїну. Пунктирна лінія позначає рівень вихідного тону.



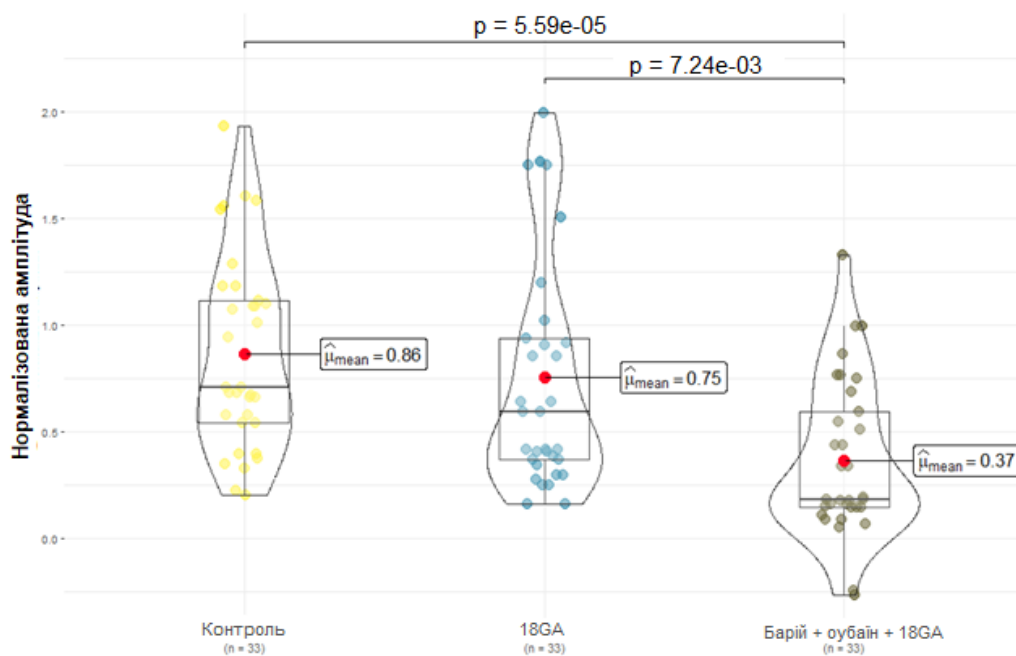
**Рис. 4.2.1.2. Різниця між амплітудами ацетилхолін-індукованого розслаблення в контролі та після застосування  $\text{Ba}^{2+}$  та оубаїну.**

Статистично значуща різниця в амплітуді ацетилхолін-індукованого розслаблення в контролі, та після блокування KIR каналів та  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  помпи за допомогою  $\text{Ba}^{2+}$  (100 мкМоль) та оубаїну (40 мкМоль) ( $n=38$ ,  $p=0.012$ ) є очевидною.

Суміш з  $\text{Ba}^{2+}$  та оубаїну була використана за методом Едвардса, де барій блокує калієві канали вхідного випрямлення, а оубаїн використовується для блокування  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  помпи, що, може, бути активованим за рахунок підвищених концентрацій  $\text{K}^+$  у міжклітинному просторі (209, 210)

#### 4.2.2 Відносний внесок міоендотеліальних контактів і мембран гладеньком'язових клітин у поширення ендотелій-залежного гіперполяризуючого фактору

Для кількісного оцінювання внеску EDHF в ацетилхолін-індуковане розслаблення, було досліджено важливість щілинних контактів. Селективне блокування цих контактів за допомогою 18-GA показало, що ацетилхолін-індуковане розслаблення зменшилося на  $50\% \pm 9\%$  ( $n=32$ ) зі сценарієм, коли були заблоковані, лише KIR-канали. Водночас, використання самого 18-GA, суттєво не впливало на амплітуду ацетилхолін-індукованого розслаблення (Рис. 4.2.2). Це свідчить про те, що значна частина EDHF діє безпосередньо через щілинні контакти, тоді як, інша частина ( $\sim 50\%$ ) — діє через KIR-канали мембрани гладеньком'язових клітин.

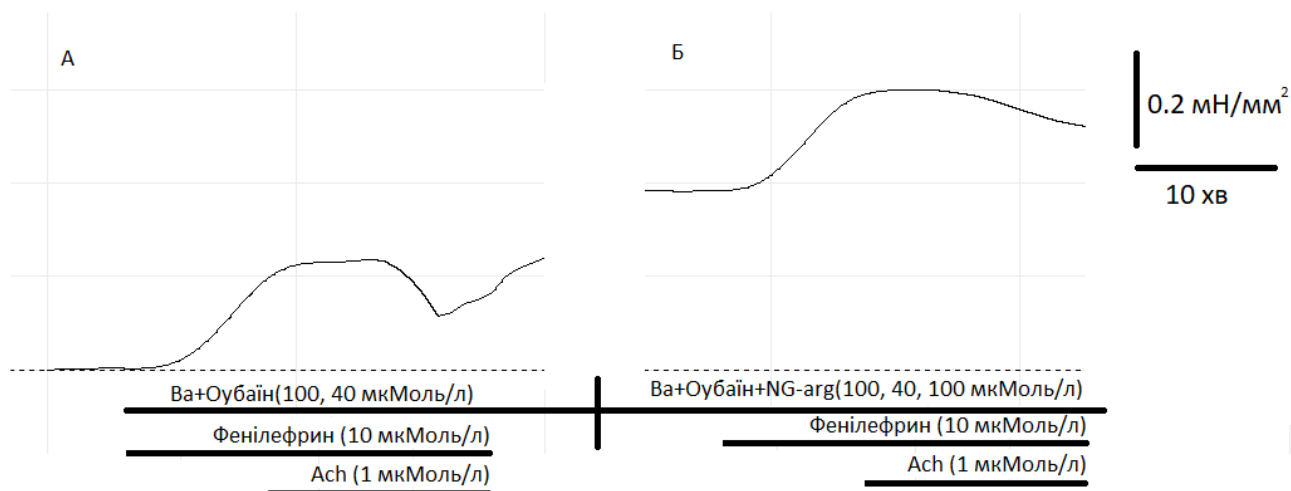


**Рис. 4.2.2. Різниця між амплітудами ацетилхолін-індукованого розслаблення в контролі, після застосування 18-GA та 18-GA сумісно з інгібування KIR каналів**

Аплікація 18-GA не викликала достовірних змін у амплітуді ацетилхолін-індукованого розслаблення, у той час як, використання  $\text{Ba}^{2+}$  та оубайну разом з 18-GA (10 мкмоль) для блокування KIR каналів викликала зменшення в амплітуді на  $67\%$  ( $n=33$ ,  $p=0.000724$ ).

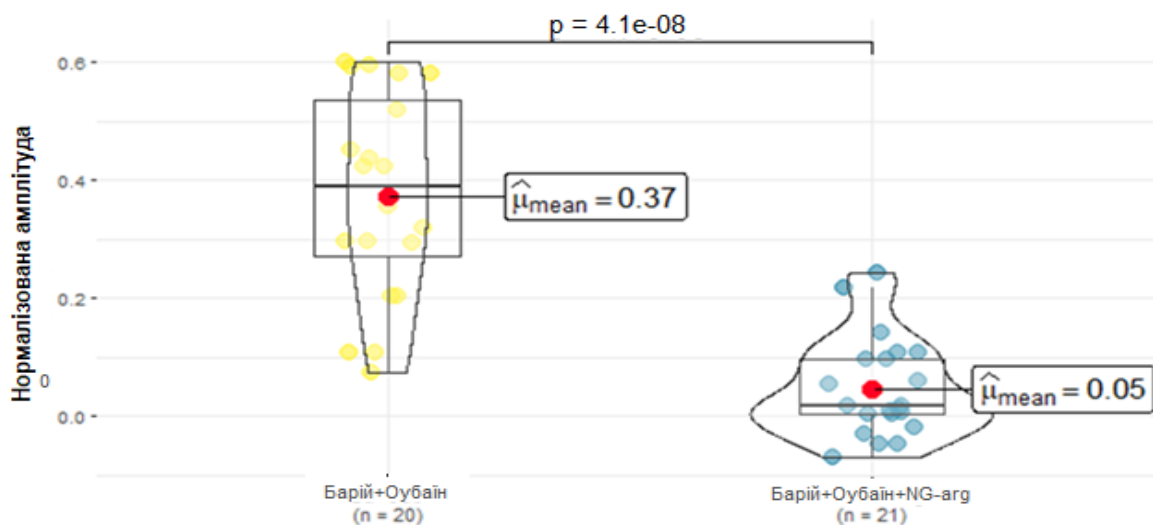
### 4.2.3 Внесок оксиду азоту та KIR-каналів у ацетилхолін-індуковане розслаблення аорти

Для визначення ролі NO в ацетилхолін-індукованому розслабленні, ми інгібували ендотеліальну NO-синтазу за допомогою NG-arg, а щоб усунути внесок KIR-каналів, додавали  $\text{Ba}^{2+}$  разом з оубаїном. Результат продемонстрував суттєве зменшення розслаблення, що було на  $77\% \pm 12\%$  ( $n=21$ ) меншим, ніж у контролі, який включав, лише барій та оубаїн (Рис. 4.2.3.1, Рис. 4.2.3.2). Вищенаведене підкреслює внесок NO, вказуючи на те, що він відіграє значну роль в ацетилхолін-індукованому розслабленні на тлі попереднього фенілефрин-викликаного скорочення.



**Рис. 4.2.3.1. Запис експерименту з порівнянням амплітуди розслаблення після блокування KIR каналів, та після блокування NO синтази.**

Амплітуду ацетилхолінового розслаблення на тлі дії Барію та Оубаїну можна побачити на частині графіку А, в той час, як амплітуду ацетилхолінового розслаблення на тлі сумісного блокування KIR каналів та NO-синтази, можна спостерігати на частині графіку Б. Пунктирна лінія позначає рівень вихідного тону.

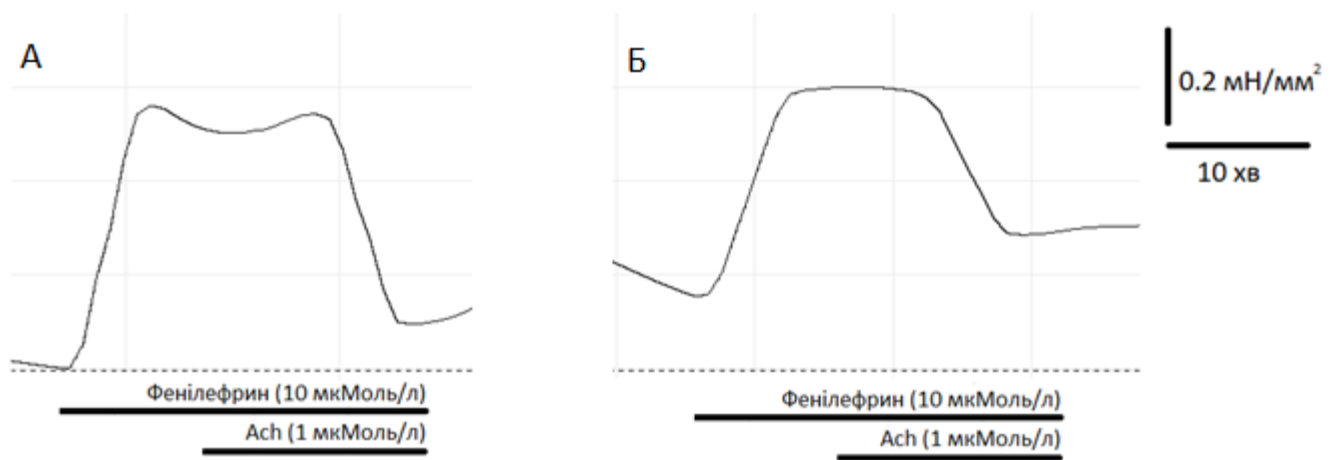


**Рис. 4.2.3.2. Різниця в амплітудах ацетилхолін-індукованого розслаблення в контролі (що включав аплікацію  $\text{Ba}^{2+}$  та оубаїну) та після застосування NG-arg разом з  $\text{Ba}^{2+}$  та оубаїну.**

Після використання NG-arg(100 мкмоль) на тлі  $\text{Ba}^{2+}$  та оубаїну, чітка різниця в амплітуді ацетилхолін-індукованого розслаблення помітна ( $n=21$ ,  $p=0.00000041$ ), та ця різниця становила 77 %.

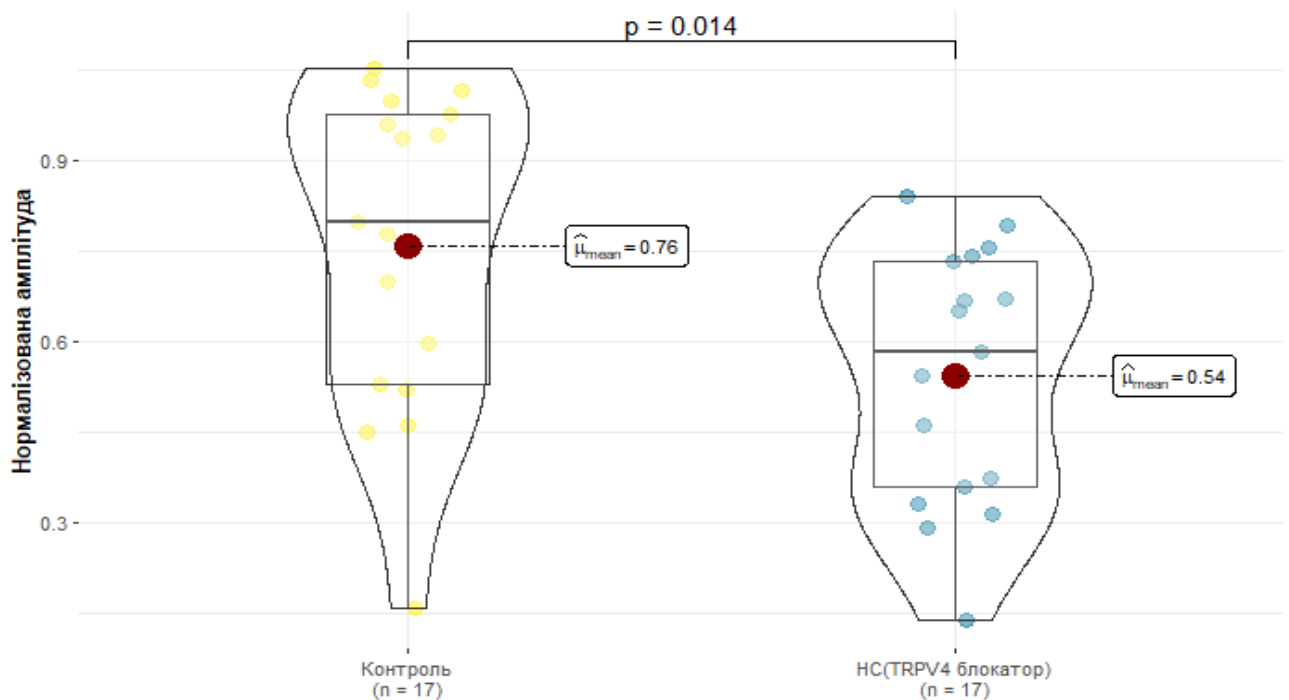
#### 4.2.4 Внесок TRPV4-каналів в ацетилхолін-індукованому розслабленні

Для вивчення ефектів ендотеліального TRPV4, який, як відомо, пов'язаний із калієвим компонентом EDHF, ми спробували селективно блокувати функціонування цього каналу. Показано, що інгібування каналу TRPV4 селективним блокатором HC-067047 призводило до зменшення амплітуди ацетилхолін-індукованого розслаблення на тлі фенілефрин-викликаного скорочення на  $25\% \pm 9\%$  ( $n=17$ ) (Рис. 4.2.4.1, Рис.4.2.4.2.). Це спостереження підкреслює важливість TRPV4 у регуляції тону аорти, що передбачає його зв'язок з ендотеліальними ІК/СК каналами і, як наслідок, EDHF.



**Рис. 4.2.4.1. Запис експерименту з порівнянням амплітуди розслаблення в контролі та після блокування TRPV4.**

Вплив блокатора TRPV4-каналу HC-067047 на амплітуду ацетилхолінового розслаблення фенілефрин-викликаного скорочення сегменту аорти щура. На А – ацетилхолінове розслаблення в контролі; На Б – ацетилхолінове розслаблення на 20-й хв. дії HC-067047. Пунктирна лінія позначає рівень вихідного тону. Також можна побачити наявність міоендотеліального фідбеку в контролі, та його відсутність після блокування TRPV4.

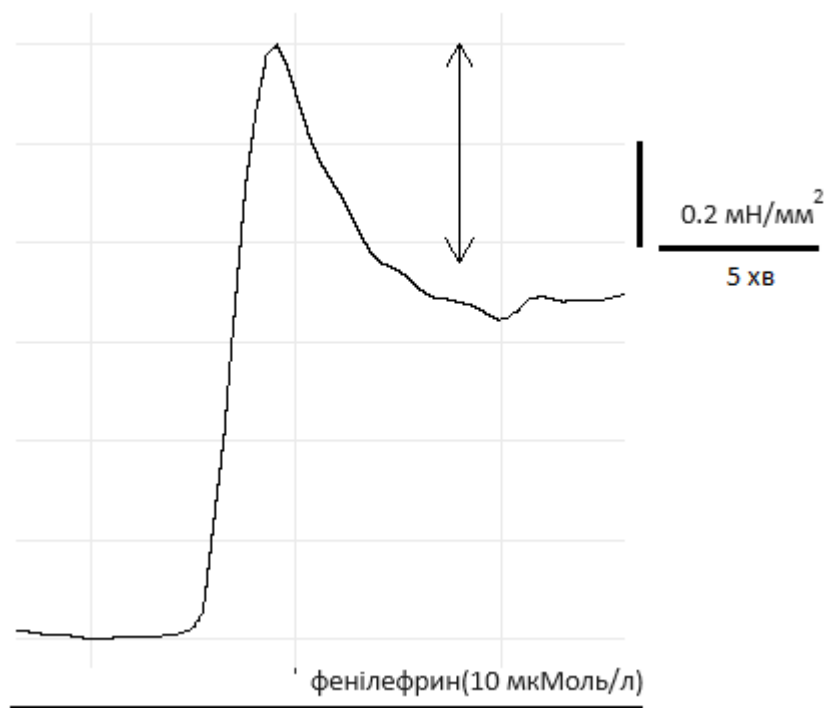


**Рис. 4.2.4.2. Порівняння амплітуд ацетилхолін-індукованого розслаблення після застосування блокатору TRPV4 НС-067047, та в контролі.**

Різниця в амплітуді ацетилхолін-індукованого розслаблення в контролі та після використання блокатору TRPV4 НС-067047(1 мкмоль) є статистично значущою (n=17, p=0.014) та складає 25 %.

Іншим шляхом, через який TRPV4 канал робить внесок у регуляцію судинного тонуусу, є ефект міоендотеліального зворотного зв'язку. Було показано цей ефект на піках фенілефрин-індукованих скорочень, і його можна кількісно оцінити, визначивши різницю між фазним і тонічним компонентами фенілефрин-індукованих скорочень (211, 212) (Рис. 4.2.4.3).





**Рис. 4.2.4.3. Ілюстрація явища міоендотеліального фідбеку на тлі фенілефринового скорочення.**

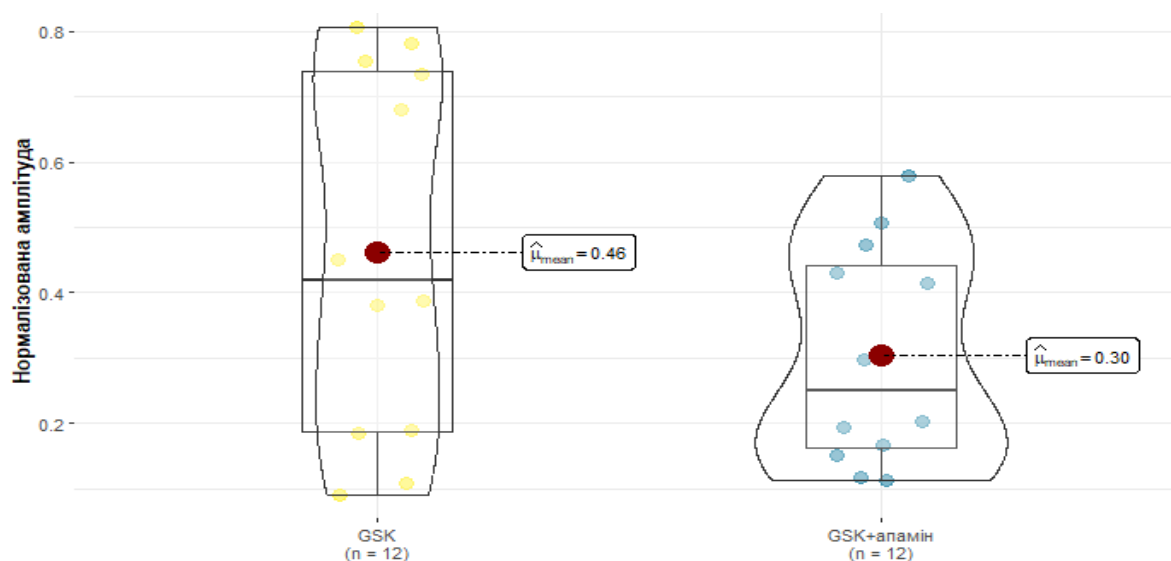
Явище міоендотеліального фідбеку, показане на тлі фенілефринового скорочення, де стрілками позначені пік фазового скорочення, та перехід у тонічне. Пунктирна лінія позначає рівень вихідного тону.

Було помічено, що цей ефект міоендотеліального зворотного зв'язку зникає на тлі застосування HC-067047 упродовж 20 хв. У контролі його величина становила приблизно  $10\% \pm 8\%$  ( $n=20$ ) від контрольного ацетилхолін-індукованого розслаблення. Так розбіжності у величині ефекту, ймовірно, пов'язані з різною щільністю каналу TRPV4 в стінці аорти.

#### 4.2.5 Внесок ІК/SK каналів у TRPV4 залежне розслаблення

Наступним етапом роботи було визначення кількісного співвідношення внесків кальцій-залежних калієвих каналів SK та ІК, у TRPV4-опосередковане розслаблення аорти. Відповідно, аби викликати розслаблення аорти нами був використаний селективний агоніст TRPV4 GSK101, а розслаблення у відповідь на нього складало  $28\% \pm 7\%$  (n=12) від максимального фенілефрінового скорочення, що збігається з наведеними вище результатами щодо використання блокатору HC-067047.

Для визначення внеску кальцій-залежних калієвих каналів малої провідності у TRPV4-залежному розслабленні був використаний селективний блокатор цих каналів, апамін у концентрації 0.1 мкмоль. Блокування SK каналу показало, що TRPV4-індуковане розслаблення ставало на  $55\% \pm 11\%$  (за умов відсутньої статистичної значущості) менше відносно контролю (Рис. 4.2.5).



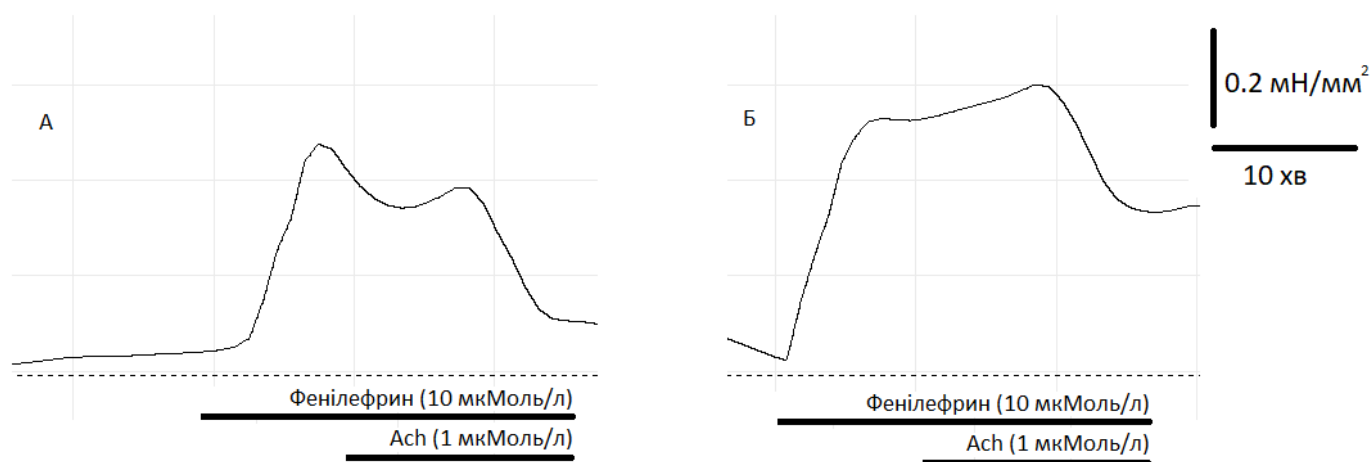
**Рис. 4.2.5. TRPV4-індуковане розслаблення в контролі та на тлі дії апаміну.**

Блокування каналів SK апаміном (0.1 мкмоль), призвело до зменшення амплітуди GSK101-індукованого розслаблення на 55 %, однак статистична різниця між двома групами не була значущою.

Отримані результати, ймовірно, свідчать про те, що приблизно 45 % розслаблення можуть бути пояснені внеском ІК каналів, а внесок СК каналів є незначущим, як відомо з літературних джерел (213).

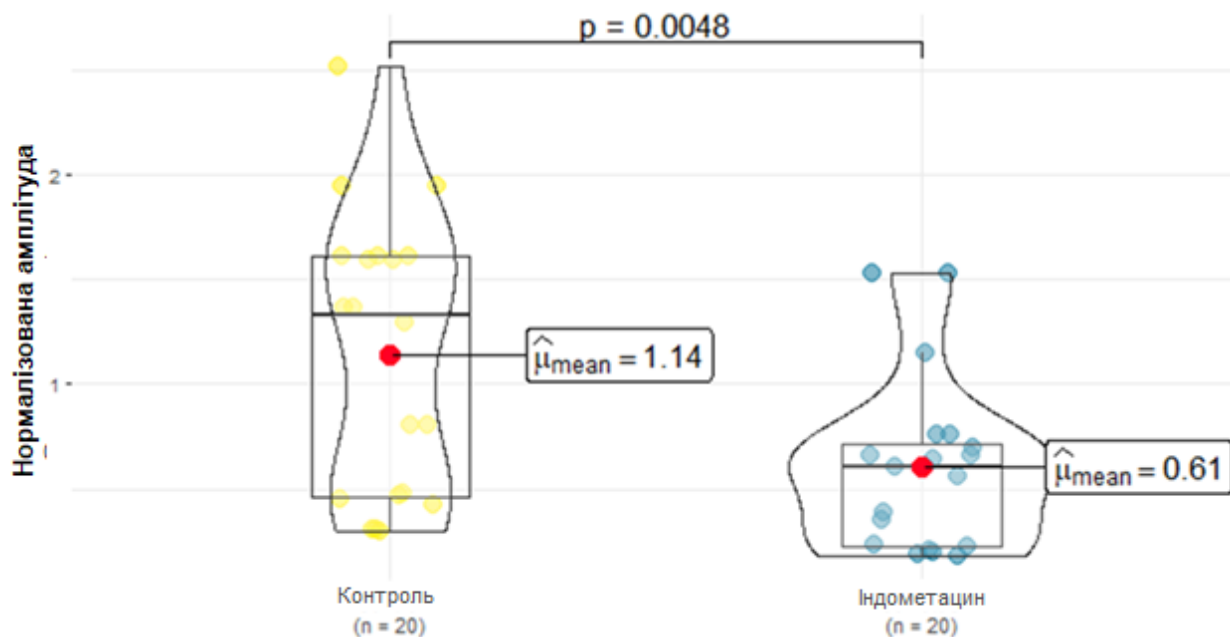
## 4.2.6 Роль простагландинів в ацетилхолін-індукованому розслабленні

Наступний елемент ацетилхолін-індукованого ендотелій-залежного розслаблення пов'язаний із передачею сигналу простагландинами, а саме по через сигнальний шлях протеїнкінази А, що є подібний до NO-шляху. Неселективне інгібування циклооксигенази 1 індометацином показало, що амплітуда ацетилхолін-індукованого ендотелій-залежного розслаблення була на  $44\% \pm 14\%$  ( $n=20$ ) меншою, відносно контролю (Рис. 4.2.6.1, Рис. 4.2.6.2).



**Рис. 4.2.6.1. Запис експерименту з порівнянням амплітуди розслаблення аорти на тлі фенілефринового скорочення в контролі та після блокування ЦОГ-1/2.**

На А можна побачити амплітуду ацетилхолінового розслаблення, в контролі, а на Б. амплітуду ацетилхолінового розслаблення на 20 хвилині дії 1 мкМоль/л блокатору ЦОГ-1/2 індометацину. Пунктирна лінія позначає рівень вихідного тону.



**Рис. 4.2.6.2 Порівняння амплітуди ацетилхолін-індукованого розслаблення в контролі та на тлі 20 хвилинної дії індометацину.**

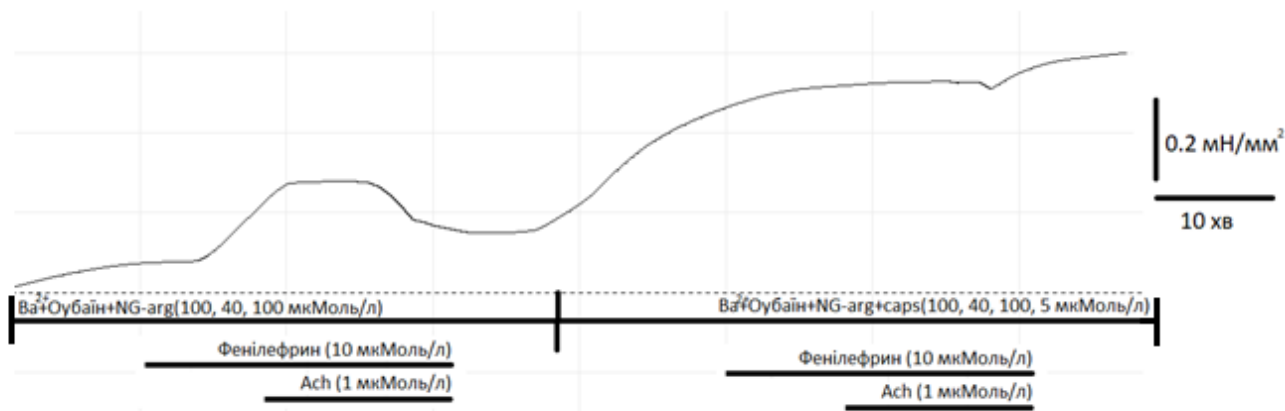
Використання індометацину (1 мкмоль) призводило до статистично значущого ( $n=20$ ,  $p=0.0048$ ) зменшення амплітуди ацетилхолін-індукованого розслаблення на 44 % відсотки.

В ході нашого дослідження для перевірки, природи досліджуваного дифузного фактору протаноїдної природи, був використаний селективний блокатор ліпооксигенази зілеутон. Наші результати показали, що блокування ліпооксигенази зілеутоном, не призводило до ефектів аналогічних ефектам індометацину.

Вищезазначена вказує на те, що саме простагліцин є задіяний у регуляції тону судинної стінки аорти.

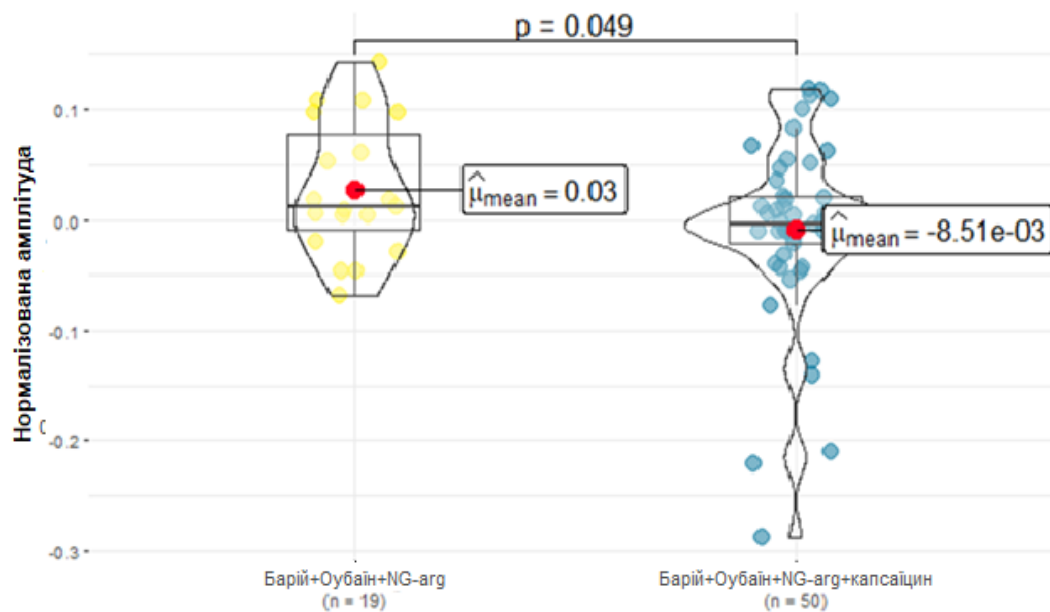
#### 4.2.7 Внесок сенсорної іннервації в ацетилхолін-індуковане розслаблення аорти

Ще одним елементом регуляції скоротливості аорти, є субстанція Р та кальцитонін-ген зв'язаний пептид, що вивільняються із сенсорних нервових закінчень у відповідь на дію ацетилхоліну та можуть діяти на  $K_{ATP}$  канали та на NO залежний сигнальний шлях. Наші результати свідчать про те, що залишкові  $10\% \pm 4\%$  ( $n=50$ ) ацетилхолін-індукованого розслаблення, що були спостереженні в наших експериментах, можуть, бути приписані до ефектів  $K_{ATP}$ -каналів на ГМК, активованим кальцитонін-ген зв'язаним пептидом, який вивільняється із сенсорних нервових закінчень після активації ацетилхолінових рецепторів. Сенсорна денервація цих нервових закінчень шляхом попередньої аплікації 1 мкмоль/л капсаїцину протягом 20 хвилин у поєднанні з подальшою блокадою NO-синтази та KIR-каналів призводила до зменшення амплітуди ацетилхолін-індукованого розслаблення порівняно зі сценарієм, коли блокували тільки NO-синтазу та KIR-канали, фактично усуваючи ці 10% розслаблення та повністю блокуючи ефект ацетилхоліну ( $n=50$ ) (Рис. 4.2.7.1., Рис. 4.2.7.2.).



**Рис. 4.2.7.1. Запис експерименту з порівнянням амплітуди розслаблення аорти на тлі фенілефринового скорочення після блокування KIR каналів та NO-синтази, та після додаткової сенсорної денервації капсаїцином.**

Сумісне блокування KIR каналів та NO-синтази можна побачити на лівій частині графіку, а сенсорну денервацію капсаїцином разом з сумісним блокуванням KIR каналів та NO-синтази можна побачити на правій частині графіку. Пунктирна лінія позначає рівень вихідного тону

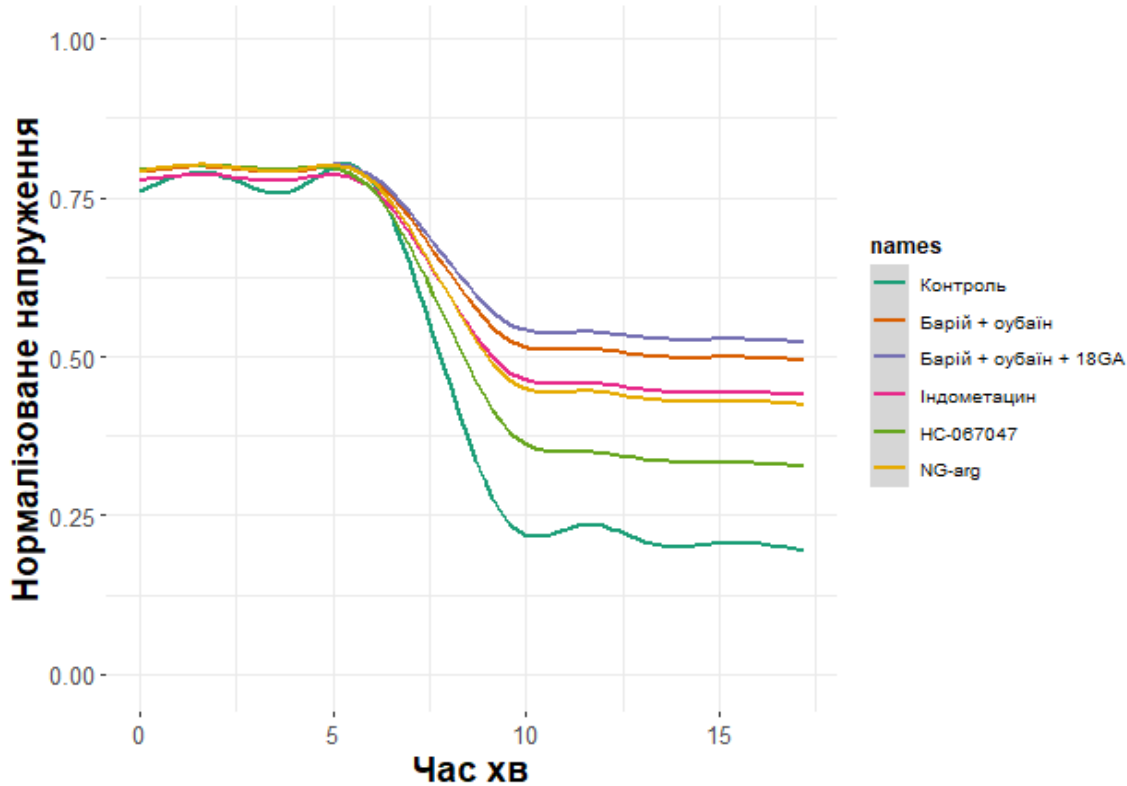


**Рис. 4.2.7.2. Порівняння амплітуд ацетилхолінового розслаблення в контролі ( $\text{Ba}^{2+}$ , оубаїну та NG-Arg) та після аплікації  $\text{Ba}^{2+}$ , оубаїну, NG-Arg з капсаїцином.**

Використання 5 мкмоль/л капсаїцину на фоні використання  $\text{Ba}^{2+}$ , оубаїну та NG-Arg призводило до повної відсутності ацетилхолін-індукованого розслаблення.

Для підтвердження ролі  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -каналів в ацетилхолін-індукованому розслабленні аорти ми застосували специфічний інгібітор цих каналів глібенкламід (214) і спостерігали те ж саме: зменшення на 10 % амплітуди розслаблення, що свідчить про те, що саме вони є джерелом цього розслаблення (n=11).

У підсумку наше дослідження компонентів ацетилхолінового розслаблення аорти показало, що блокування KIR знижує амплітуду ацетилхолінового розслаблення на 50 %, блокування KIR та міоендотеліальних контактів на 65 %, блокування ЦОГ на 38 %, блокування TRPV4 на 25 %, блокування KIR та NO разом на 77 %, а блокування KIR, NO та сенсорна десенситизація разом прибирають ацетилхолінове розслаблення повністю (Рис. 4.2.9)



**Рис. 4.2.9. Узагальнюючий графік із зображенням амплітуд ацетилхолінового розслаблення.**

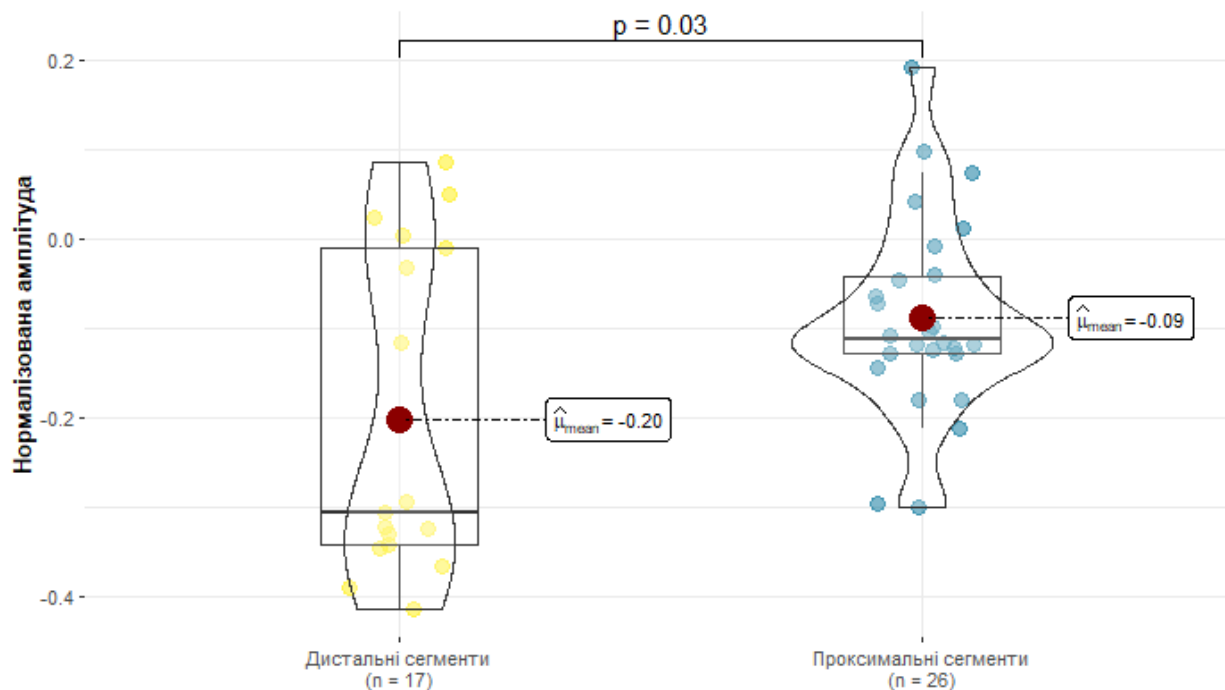
Для побудови графіку були використані найбільш репрезентативні записи при блокуванні різних компонентів ацетилхолін-індукованого розслаблення. Трейси для графіку були нормалізовані до контрольного розслаблення, а також був використаний метод згладжування lowess з фактором = 0.119.

Вищенаведені результати опубліковані в: **Mezhenskyi OR, Philypov IB.** Evaluation of the component's contribution in endothelium-dependent acetylcholine-induced relaxation of the rat aorta. *Fiziol Zhurnal* 70: 26–34, 2024. doi: 10.15407/FZ70.02.026

### **4.3 Вплив росіглітазону на компоненти ацетилхолін-індукованого розслаблення**

Відомо, що PPAR- $\gamma$  потенційно здатний впливати на функціонування судинної стінки із залученням багатьох різних механізмів, однак безпосереднього визначення його впливу на ці компоненти в досліджуваному об'єкті на даний момент із літературних джерел маловідомі. Для визначення його впливу, ми повторили ті самі схеми експериментів, що й у контролі, за умов присутності 5 мкмоль/л активатора PPAR- $\gamma$  росіглітазону, упродовж 50 хвилин, що призводило до зміни базального тону аорти на  $-11\% \pm 9\%$  (Рис. 4.3.1). Водночас було помічено, що існує варіація в змінах базального тону аорту у відповідь на аплікацію росіглітазону — у дистальних сегментах росіглітазон мав більший вплив, у порівнянні з проксимальними сегментами грудної аорти ( $p=0.03$ ,  $n=26$ ).





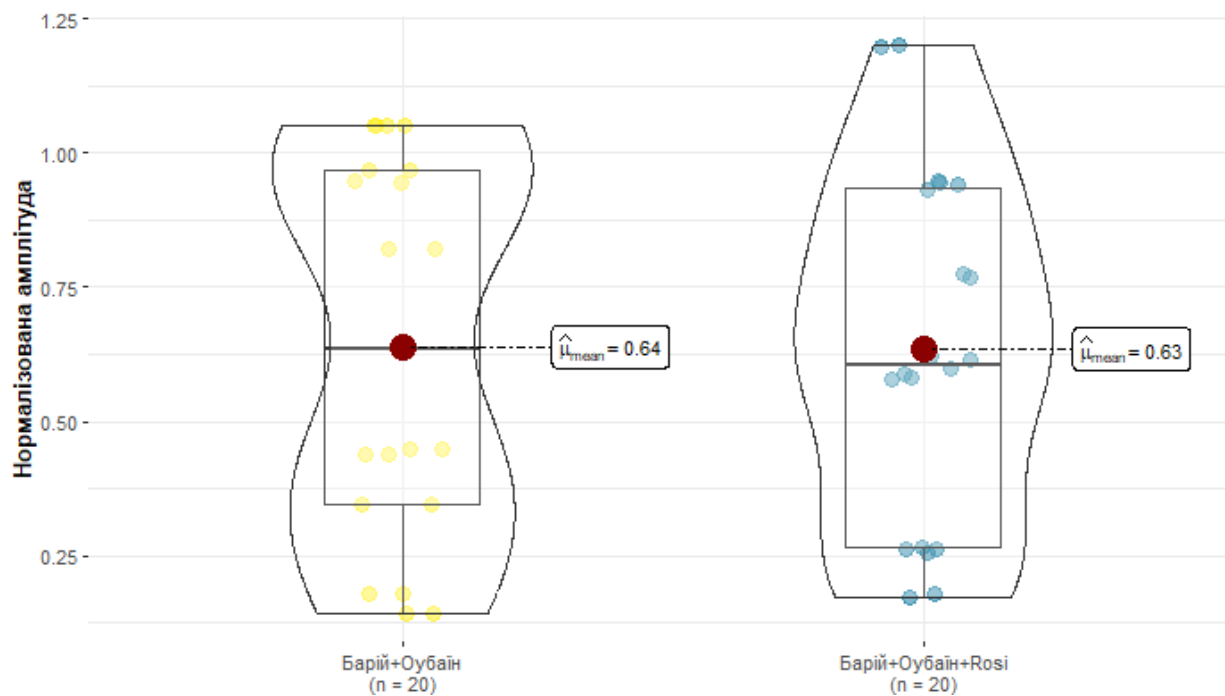
**Рис. 4.3.1. Вплив росіглїтазону на базальний тонус проксимальних та дистальних сегментів аорти щура.**

Порівняння впливу росіглїтазону (5 мкмоль) на базальний тонус, між проксимальними та дистальними ділянками грудної аорти щура, де ми бачимо статистично значущу різницю - в дистальних сегментах росіглїтазон викликав більш суттєве зменшення базального тонусу, що, може, бути пов'язано з більшою щільністю потенціал-залежних кальцієвих каналів.

Також, було помічено, що у випадку ушкодженого або усунутого ендотелію, ефект росіглїтазону мав протилежну направленість — він підвищував базальний тонус на  $23 \% \pm 16 \%$ .

### 4.3.1 Ефект росіглітазону на KIR-залежну компоненту ацетилхолінового розслаблення

Наші результати показують, що попереднє застосування росіглітазону не впливало на амплітуду ацетилхолін-індукованого розслаблення в діабеті 2 типу. Це вказує на відсутність прямого ефекту росіглітазону на KIR або/і на відсутність впливу PPAR- $\gamma$  на експресію KIR (Рис. 4.3.2).



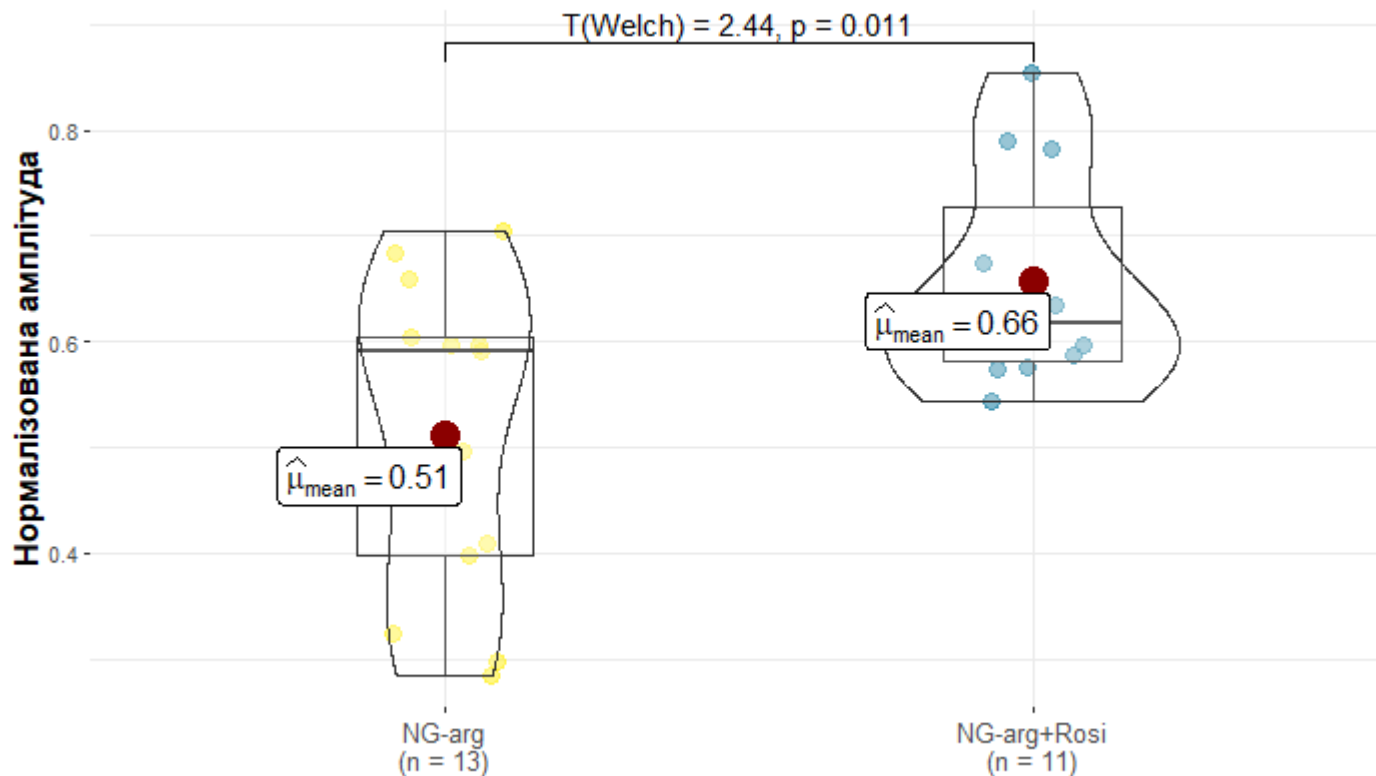
**Рис. 4.3.2. Вплив росіглітазону на KIR компоненту EDHF.**

Використання росіглітазону на фоні блокування KIR та Na/K обмінника  $\text{Ca}^{2+}$  (40 мкмоль) та оубаїном(100 мкмоль) за методом Едвардса, показало відсутність ефекту росіглітазону на це явище.

### 4.3.2 Ефект росіглітазону на NO-залежну компоненту ацетилхолінового розслаблення

Наступним етапом ми визначили вплив росіглітазону на NO компонент ацетилхолін-індукованого розслаблення. При сумісній дії росіглітазону, N-arg та  $\text{Ba}^{2+}$  і оубаїну, було показано, що ефект блокування NO-синтази був на  $36\% \pm 19\%$  меншим, ніж у контролі (Рис. 4.3.3), це вказує на те, що росіглітазон посилює NO-залежне розслаблення напряду або за рахунок впливу на низхідні елементи сигнального шляху NO.

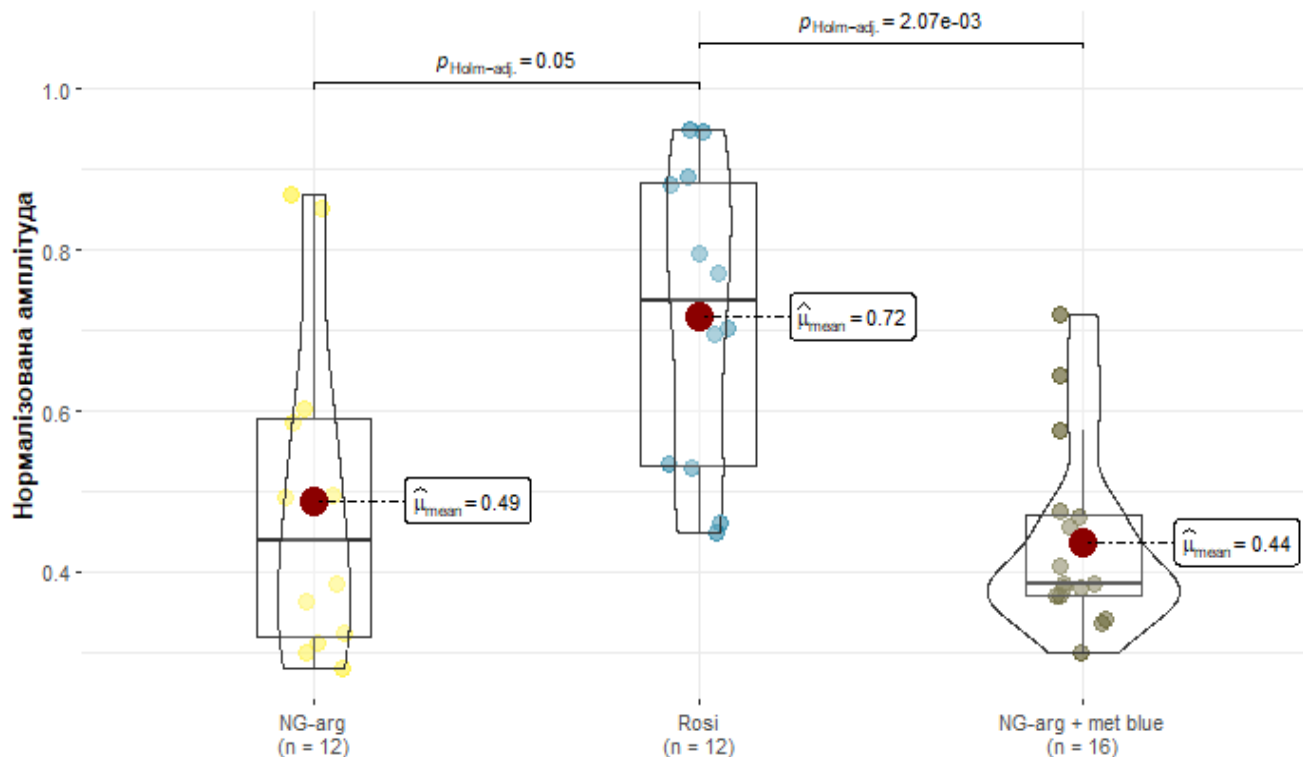
Використання NG-arg, на фоні росіглітазону призводило до таких самих змін у базальному тонусі, як і одиночне застосування NG-arg, що вказує на відсутність ефектів росіглітазону на базальний рівень секреції NO, та узгоджується з літературними даними які вказують, що використання росіглітазону не призводило до суттєвих змін у доступності NO (215).



**Рис. 4.3.3. Ефект росіглітазону на NO функцію в щурчій аорті.**

Використання росіглітазону(5 мкмоль) на фоні блокування функції NO-синтази NG-arg(100 мкмоль), призводили до зменшення в амплітуді ацетилхолін-індукованого розслаблення на 36 % що є суттєво меншим за значення в контролі, та вказує на те, що росіглітазон посилює NO-залежне розслаблення.

Подальші експерименти були направлені на визначення конкретної ланки сигнального шляху NO, на яку впливає росіглітазон. Для цього ми використали 10 мікромоль/л метиленового синього, для блокування розчинної гуанілатциклази — одного з елементів NO-залежного сигнального шляху (Рис. 4.3.4) (208).



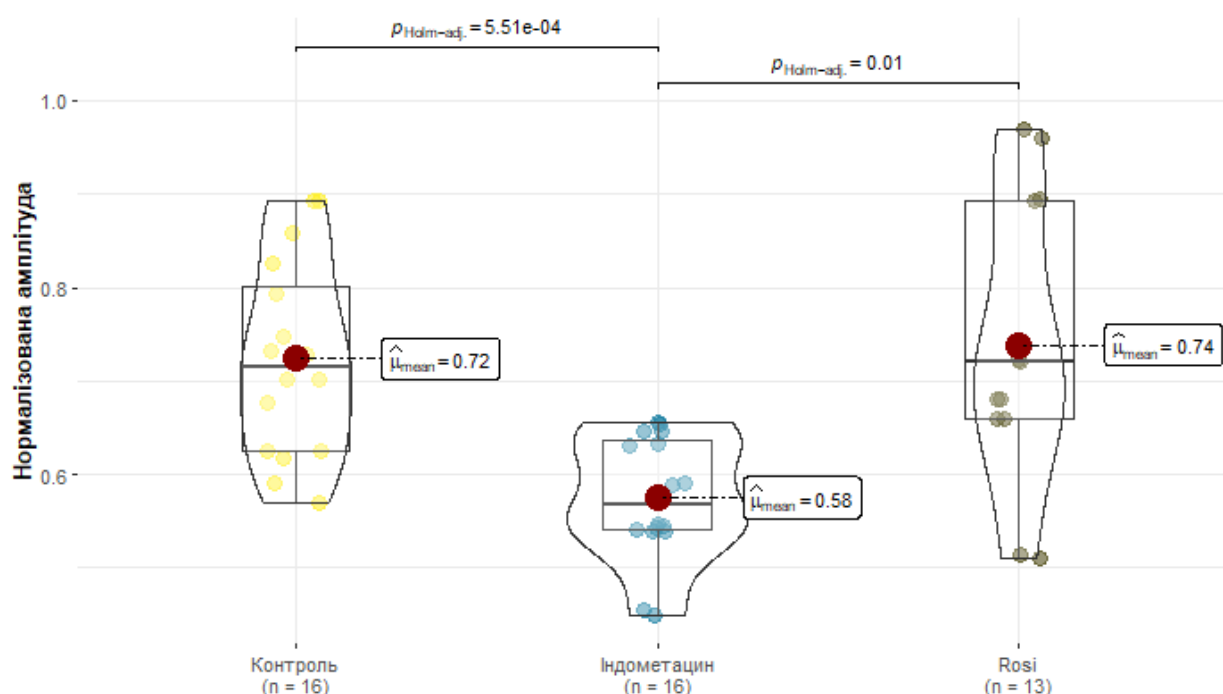
**Рис. 4.3.4. Амплітуда ацетилхолін-індукованого розслаблення після аплікації NG-arg, росіглітазону, та при сумісній дії NG-arg та метиленового синього.**

Використання метиленового синього(10 мкмоль) разом з NG-arg(100 мкмоль) дозволило позбутися ефектів росіглітазону(5 мкмоль) показаних на NG-arg, що вказує, на те, що саме через гуанілатциклазу діє росіглітазон.

Наші результати показали, що використання гуанілатциклази на тлі преаплікації росіглітазону викликала збільшення базального тонусу, та збільшення амплітуди ацетилхолін-індукованого розслаблення, не спостерігалось, що вказує на прямий або непрямий ефект росіглітазону на активність, або на експресію розчинної гуанілатциклази.

### 4.3.3 Дія росіглітазону на ЦОГ-залежну компоненту ацетилхолінового розслаблення

Наступним кроком ми перевірили вплив росіглітазону на ЦОГ- $\frac{1}{2}$  залежну компоненту ацетилхолін-індукованого розслаблення, та побачили, що аплікація росіглітазону здатна підсилити ацетилхолін-індуковане розслаблення, за умов блокування циклоксигенази індометацином, і повернути амплітуду розслаблення до значень близьких до контрольних. Ймовірно, це пов'язано зі здатністю PPAR- $\gamma$  впливати на ЦОГ сигнальний шлях (Рис. 4.3.5).

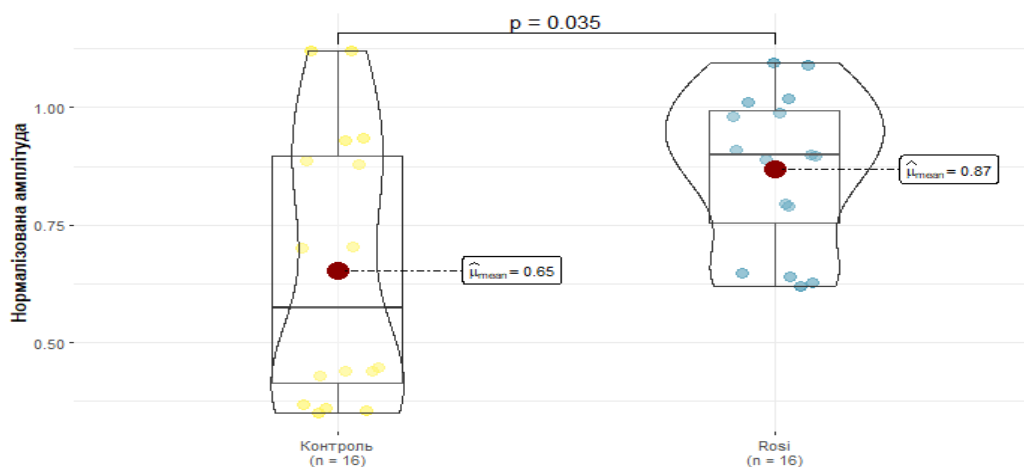


**Рис. 4.3.5. Ефект росіглітазону на ЦОГ- $\frac{1}{2}$  компоненту, ацетилхолін-індукованого розслаблення.**

Використання росіглітазону (5 мкмоль) на фоні блокування функцій ЦОГ індометацином (1 мкмоль), показало відновлення амплітуди ацетилхолін-індукованого розслаблення до контрольних значень, що вказує на те, що росіглітазон має вплив на ЦОГ сигнальний шлях.

#### 4.3.4 Вплив росіглітазону на потенціалзалежні кальцієві канали L-типу мембрани гладеньком'язових клітин

Враховуючи ефекти росіглітазону на базальний тонус та результати молекулярного докінгу (дивись ст. 96–97) ми вирішили дослідити вплив росіглітазону на кальцієві канали. Для цього ми перевірили вплив росіглітазону на скорочення, що викликали гіперкалієвим розчином Кребса ( $[K^+] = 60$  мМ), задля можливості виділити саме ефект потенціалзалежних кальцієвих каналів. Наші дані показують, що після аплікації росіглітазону амплітуда гіперкалієвого скорочення зростала на  $32\% \pm 8\%$  порівняно з контролем (Рис. 4.3.6), що вказує на здатність росіглітазону прямо впливати на активність потенціалзалежних кальцієвих каналів, або вплив PPAR- $\gamma$  на їх експресію. Також наші дані показали, що ці канали не задіяні у впливі росіглітазону на ацетилхолін-індуковане розслаблення на тлі фенілефринового скорочення.



**Рис. 4.3.6. Вплив росіглітазону на амплітуду гіперкалієвого скорочення аорти щурів.**

Використання гіперкалієвого розчину ( $[K^+] = 60$  мМ) призводило до скорочення аорти, що було на 32 % більшим після використання росіглітазону (5 мкмоль).

Вищезазначені результати опубліковані в: Mezhenkyi O. R., Philippov I. B. IMPACT OF ROSIGLITAZONE ON COMPONENTS OF ENDOTHELIUM-DEPENDENT ACETYLCHOLINE-INDUCED RELAXATION OF RAT AORTA. IV міжнародна науково-практична конференція PERSPECTIVES OF CONTEMPORARY SCIENCE: THEORY AND PRACTICE (Львів 2024), 59–60.

#### 4.4 Моделювання неспецифічного зв'язування лігандів PPAR- $\gamma$ та TRPV4 з йонними каналами та сигнальними молекулами, що регулюють судинні функції методом молекулярного докінгу

У ході аналізу здатності лігандів PPAR- $\gamma$  та TRPV4 неспецифічно активувати рецептори одне одного, а також інші молекули пов'язані із судинним тонусом були отримані наступні результати (Таблиця 4.4.1.).

**Таблиця 4.4.1.**

**Передбачена константа інгібування та мінімальна вільна енергія зв'язування для перевірених білків та лігандів.**

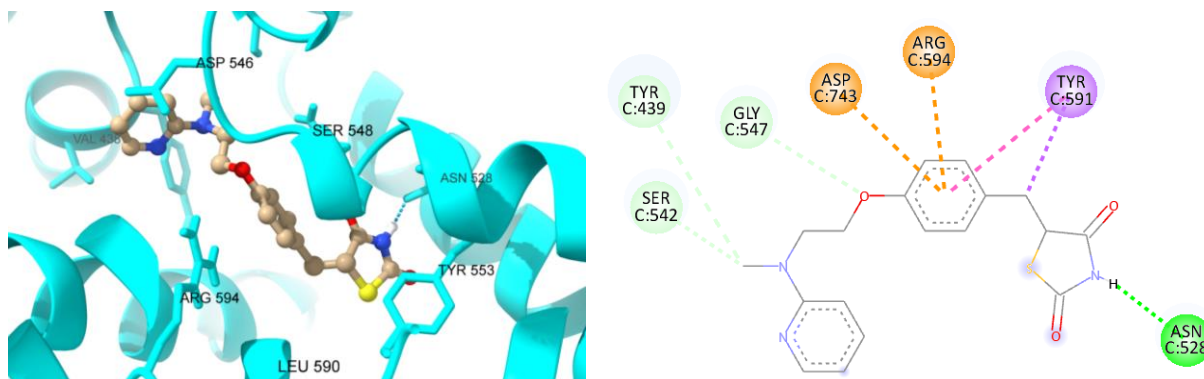
Назва	Росіглітазон	GSK101	Ейкозатрієнова кислота	Лінолева кислота	Арахідонова кислота
PPAR- $\gamma$	37.27 мілімоль/л, -8.77 kcal/mol	1.91 мікромоль/л, -7.80 kcal/mol	547.24 наномоль/л, -8.54 kcal/mol	2.06 мікромоль/л, -7.76 kcal/mol	2.03 мікромоль/л, -7.77 kcal/mol
TRPV4	41.63 мікромоль/л, -5.85 kcal/mol	577.65 наномоль/л, -8.51 kcal/mol	214.47 мікромоль/л, -5.00 kcal/mol	1.32 мілімоль/л, -3.93 kcal/mol	131.80 мікромоль/л, -5.29 kcal/mol
TRAAK	6.15 мікромоль/л, -7.11 kcal/mol	19.08 мілімоль/л, -3.32 kcal/mol	79.31 мікромоль/л, -5.47 kcal/mol	227.71 мікромоль/л, -5.65 kcal/mol	51.13 мікромоль/л, -5.39 kcal/mol
TWIK	11.63 мікромоль/л, -6.73 kcal/mol	13.32 мілімоль/л, -3.28 kcal/mol	74.22 мікромоль/л, -5.49 kcal/mol	243.19 мікромоль/л, -5.61 kcal/mol	163.83 мікромоль/л, -5.57 kcal/mol
Kv3.2	66.25 мікромоль/л, -5.51 kcal/mol	753.88 мікромоль/л, -4.25 kcal/mol	1.16 мілімоль/л, -3.09 kcal/mol	1.88 мілімоль/л, -3.11 kcal/mol	132.78 мікромоль/л, -5.44 kcal/mol
Kv1.2	89.09 мікромоль/л, -5.53 kcal/mol	975.90 мікромоль/л, -4.11 kcal/mol	2.55 мілімоль/л, -3.54 kcal/mol	1.386 мілімоль/л, -3.10 kcal/mol	798.72 мікромоль/л, -4.23 kcal/mol
CaV1.2	47.01 мікромоль/л, -5.61 kcal/mol	2.95 мілімоль/л, -3.62 kcal/mol	329.44 мікромоль/л, -5.03 kcal/mol	1.05 мілімоль/л, -3.08 kcal/mol	548.22 мікромоль/л, -4.93 kcal/mol
SK	83.09 мікромоль/л, -5.57 kcal/mol	88.87 мікромоль/л, -5.59 kcal/mol	1.11 мілімоль/л, -4.03 kcal/mol	913.73 мікромоль/л, -4.69 kcal/mol	1.14 мілімоль/л, -4.01 kcal/mol
sGC	13.68 мікромоль/л, -6.44 kcal/mol	33.84 мікромоль/л, -6.10 kcal/mol	314.45 мікромоль/л, -4.78 kcal/mol	2.27 мілімоль/л, -3.61 kcal/mol	165.90 мікромоль/л, -5.38 kcal/mol

Нами було помічено, що росіглітазон здатний зв'язуватися в концентраціях 60–80 мікромоль із потенціалзалежними, кальційзалежними та калієвими каналами



вхідного випрямлення. Це співпадає з літературними даними про здатність росіглітазону інгібувати ці канали у відповідних концентраціях у ході електрофізіологічних експериментів (216–218). Також нами було передбачено, що поза зв'язування з найменшою вільною енергією зв'язування для трьох цих каналів знаходилася на пороблокуючому сайті зв'язування, що вказує на те, що взаємодія з росіглітазоном має призводити до пригнічення активності цих каналів. Однак зважаючи на те, що в ході наших тензометричних експериментів робочі концентрації росіглітазону не перевищували 5 мкмоль/л, росіглітазон, ймовірно, не мав прямого інгібуючого впливу на струми через потенціалзалежні, кальційзалежні та калієві каналами вхідного випрямлення.

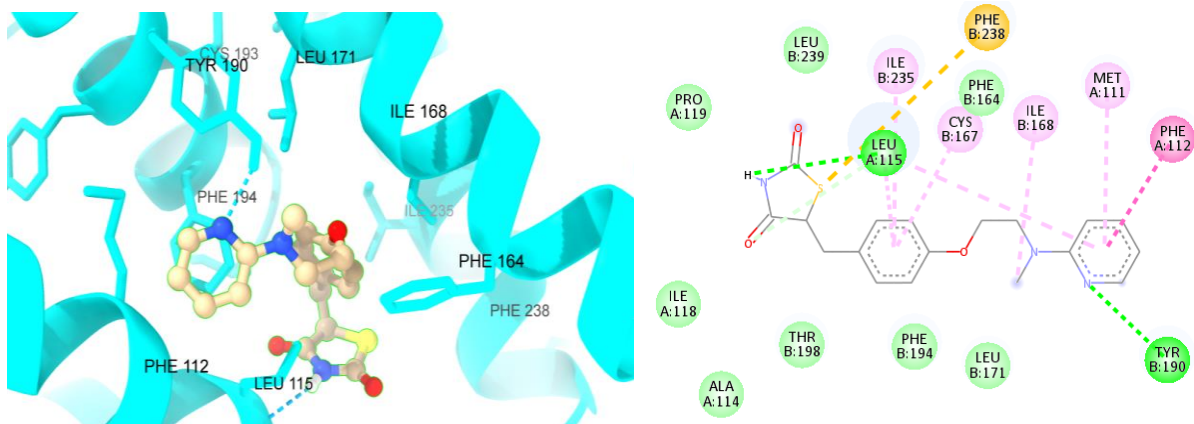
Здатність росіглітазону зв'язуватися з TRPV4 каналом була передбачена для концентрацій ~40 мікромоль/л, що підтверджується літературними відомостями про здатність росіглітазону модулювати роботу каналів родини TRP, а саме виступати в ролі активатора для каналу TRPC5 у концентраціях ~40 мкмоль/л, та виступати інгібітором каналу TRPM3 у концентраціях ~ 10 мкмоль/л (18). Аналіз передбаченої пози зв'язування росіглітазону з TRPV4 каналом із найменшою вільною енергією зв'язування показує, що зв'язування відбувається не в пороблокуючому домені, а в лігандзв'язуючому домені, що дозволяє припустити, що у випадку TRPV4 росіглітазон грає роль активатора/модулятора активності (Рис. 4.4.1). Однак, враховуючи, що передбачені концентрації для цього зв'язування є суттєво вищими за робочу концентрацію в наших експериментах, ми припускаємо, що ми не спостерігали ефекту прямої активації TRPV4 каналу росіглітазоном.



**Рис. 4.4.1. Аналіз передбаченої пози зв'язування росіглїтазону з TRPV4.**

Тривимірна та двовимірна репрезентація передбаченої пози зв'язування росіглїтазону з TRPV4 з найменшою енергією. Зелені лінії показують конвенційні водневі зв'язки, світло зелені вуглецево водневі, оранжеві показують  $\pi$ -катіоні та аніоні зв'язки, фіолетові  $\pi$ -сігма, рожеві  $\pi$ - $\pi$  зв'язки, а бузкові  $\pi$ -алкіл зв'язки

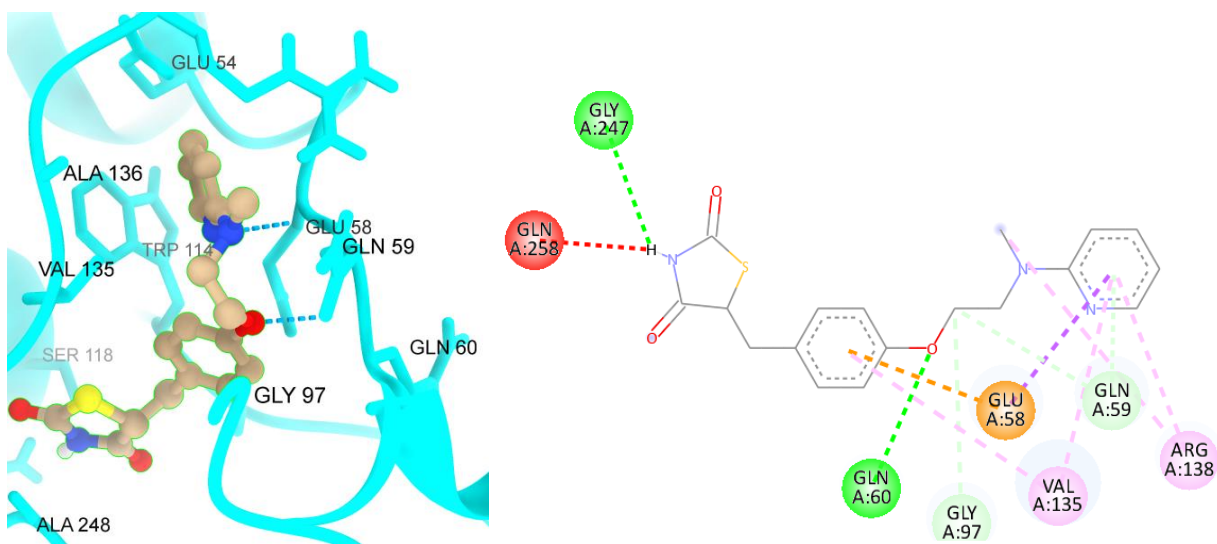
Окрім того результати молекулярного докінгу передбачують, що росіглїтазон здатний зв'язуватися з двома калієвими каналами з родини двопородомених каналів — TWIK та TRAAK, у концентраціях 6 та 12 мікромоль/л відповідно. Ці концентрації наближаються до робочих концентрацій, що були використані в наших експериментах вказуючи, на те, що ефект росіглїтазону, який був спостереження, може, бути пов'язаними зі струмами через механочутливими канали TWIK та TRAAK. Наразі немає експериментальних даних щодо впливу росіглїтазону на двопородомені калієві канали, однак враховуючи, що аналіз поз із найменшою вільною енергією зв'язування показав, що росіглїтазон зв'язується із цими каналами в лігандзв'язуючому домені, що вказує на його здатність модулювати роботу, як TWIK каналу (Рис. 4.4.2) так і TRAAK каналу (Рис. 4.4.3).



**Рис. 4.4.2. Аналіз передбачених поз зв'язування росіглїтазону з TWIK.**

Тривимірна та двовимірна репрезентація передбаченої пози зв'язування росіглїтазону з TWIK з найменшою енергією. Зелені лінії показують конвенційні водневі зв'язки, салатові — ван дер ваальсові взаємодії, світло зелені вуглецево водневі, жовті  $\pi$ -сіркові, оранжеві показують  $\pi$ -катіоні та аніоні зв'язки, фіолетові  $\pi$ -сігма, рожеві  $\pi$ - $\pi$  зв'язки, а бузкові  $\pi$ -алкіл зв'язки.

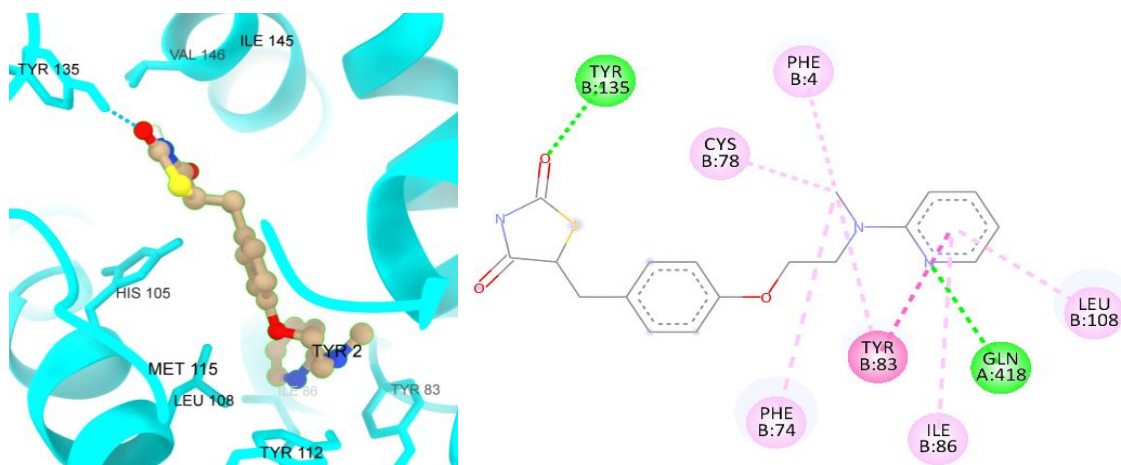
Враховуючи наближеність передбачених концентрацій до робочих концентрацій росіглїтазону в наших експериментах ми можемо припустити, що ефекти росіглїтазону на судинні реакції, які ми спостерігали можуть бути пов'язані з впливом на TWIK, та TRAAK канали.



**Рис. 4.4.3. Аналіз передбаченої пози зв'язування росіглїтазону з TRAAK.**

‘Тривимірна та двовимірна репрезентація передбаченої пози зв'язування росіглїтазону з TRAAK з найменшою енергією. Зелені лінії показують конвенційні водневі зв'язки, салатові — ван дер ваальсові взаємодії, світло зелені вуглецево водневі, червоні донор-донор зв'язки, оранжеві показують  $\pi$ -катіоні та аніоні зв'язки, а бузкові  $\pi$ -алкіл зв'язки.

Останнім вартим уваги результатом молекулярного докінгу була передбачена здатність росіглїтазону зв'язуватися з гуанїлатциклазою в концентраціях  $\sim 14$  мкмоль/л. Наразі немає літературних даних щодо зв'язування росіглїтазону з гуанїлатциклазою, однак аналіз поз із найменшою енергією зв'язування показав, що росіглїтазон зв'язується з гуанїлатциклазою в сенсорному домені (Рис. 4.4.4), у сайті зв'язування NO, що вказує на те, що зв'язування росіглїтазону з гуанїлатциклазою, може, активувати її напряду, або впливати на її афінність до NO (219). Передбачені концентрації зв'язування є близькими за значенням до наших робочих концентрацій — відповідно ефекти, що ми спостерігали, ймовірно, могли бути викликані ефектом росіглїтазону на розчину гуанїлатциклазу. Це добре корелює з нашими експериментам, у яких ефект гуанїлатциклази блокувався за допомогою метиленового синього, та не спостерігали ефекту росіглїтазону (дивись ст. 92).



**Рис. 4.4.4. Аналіз передбаченої поз зв'язування росіглїтазону з гуанїлатциклазою.**

Тривимірна та двовимірна репрезентація пози зв'язування росіглїтазону з гуанїлатциклазою з найменшою енергією. Зелені лінії показують конвенційні водневі зв'язки, світло зелені вуглецево водневі, а бузкові  $\pi$ -алкіл зв'язки, фіолетові  $\pi$ -сігма.

Вищезазначені результати опубліковані в: **Меженський О.Р.**, Філіппов І.Б. Ефект росіглїтазону на компоненти ендотелій-залежного розслаблення аорти щура в нормі та діабеті 2 типу. Науково-практичній конференції ХХІІІ читання ім.В.В. Підвисоцького (Одеса 2024).

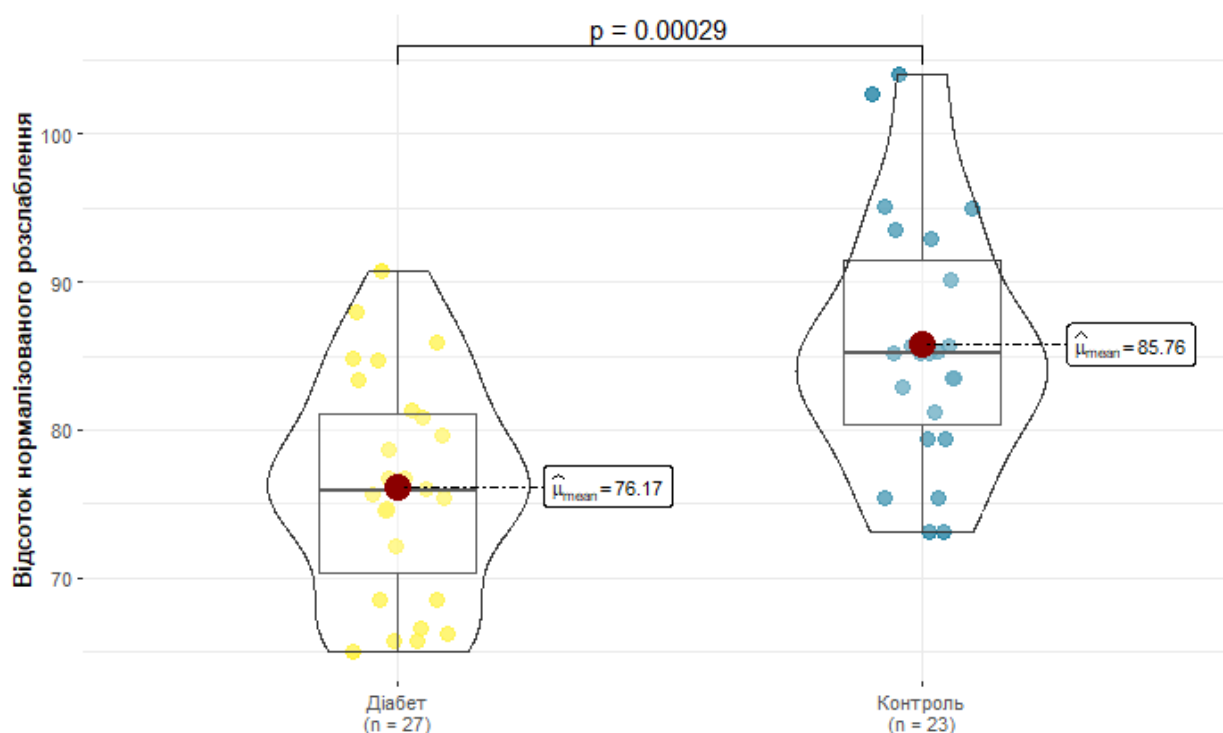
#### **4.5 Внески компонентів у ацетилхолін-індуковане розслаблення при діабеті 2 типу**

Наступним етапом нашої роботи була перевірка того, як змінюється співвідношення складових ацетилхолін-індукованого розслаблення при діабеті 2 типу, а також чи здатний, та за допомогою, яких механізмів, росіглітазон вплинути на цей процес.

Для цього в щурів лінії Wistar викликали нікотинамід-стрептозотоцин-індукований діабет 2 типу, та тих щурів, які проявили знижену толерантність до глюкози використовували в подальших експериментах, по аналогії з тими, що були проведені на нормальних щурах(220).

### 4.5.1 Амплітуда ацетилхолін-індукованого розслаблення препаратів аорти при діабеті 2 типу

Найперше було визначено різницю в амплітудах ацетилхолін-індукованого розслаблення в нормі, та в щурів із діабетом 2 типу. Наші дані свідчать, що в той час, як у контролі ця амплітуда складала в середньому 85 % від максимуму фенілефринового скорочення, у діабетичних щурів це значення складало, лише 76 %. Т-тест велча підтвердив статистичну значущість різниці ( $p=0.00029$ ,  $t_{(welch)}=4.24$ ,  $n=50$ ). Це вказує на значуще пригнічення розслаблення аорти в щурів із діабетом 2 типу (Рис. 4.6.1).



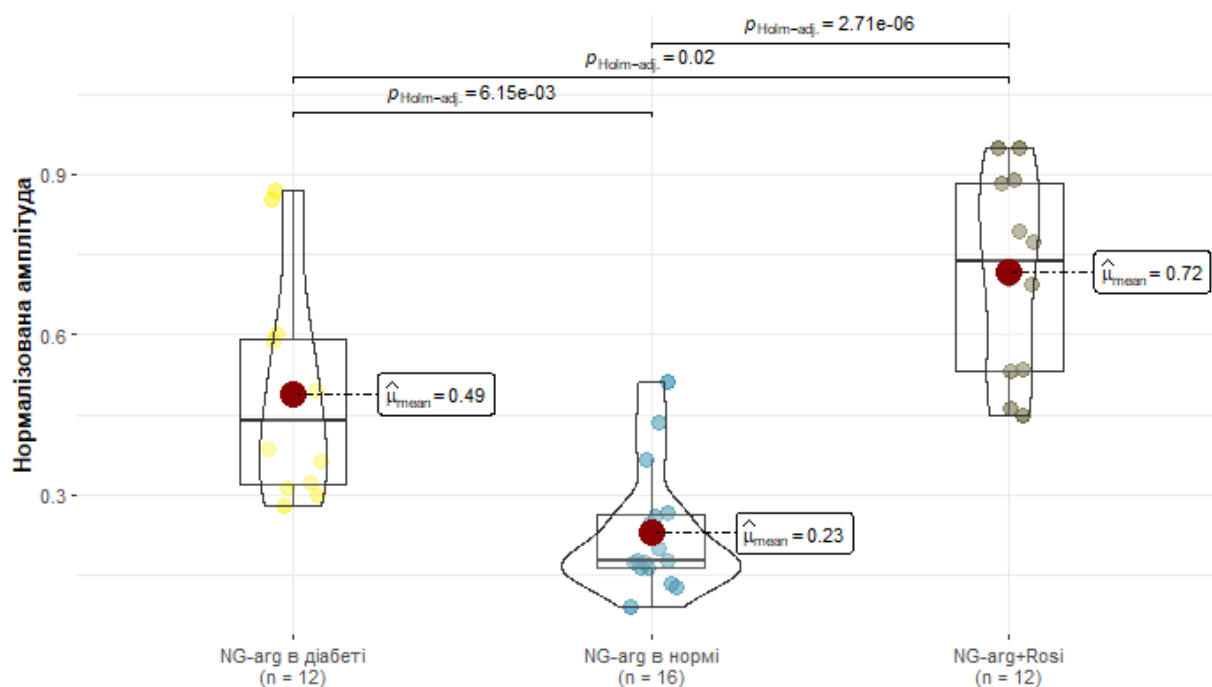
**Рис. 4.6.1. Порівняння амплітуд ацетилхолін-індукованого розслаблення сегментів аорти в нормальних та діабетичних щурів.**

Амплітуда ацетилхолін-індукованого розслаблення сегментів аорти щурів із діабетом 2 типу мала статистично значущу відмінність ( $n=27$ ,  $p=0.00029$ ) відносно норми та була на 10 % менше.

#### 4.5.2 Внесок NO в ацетилхолін-індуковане розслаблення в діабеті 2 типу та ефект росіглітазону на цей внесок

Наступним етапом нашої роботи було визначення того, які саме компоненти зазнають пригнічення у випадку діабету та наскільки зменшується їх функції. Для того, аби це визначити, були виконанні експерименти за планом ідентичним контрольним, стосовно внеску NO, KIR, ЦОГ, щілинних контактів, TRPV4 каналу.

Наші результати свідчать, що частка розслаблення, блокована аплікацією NG-arg, у діабетичних щурів ( $65\% \pm 5\%$ ) була більшою, ніж у контрольних щурів ( $38 \pm 12\%$ ), що, ймовірно, пов'язано зі зниженням функції інших елементів ацетилхолін-індукованого розслаблення, і свідчить про те, що NO внесок суттєво не зменшується, (Рис. 4.6.2) і виконує компенсаторну роллю, переймаючи на себе роботу інших компонентів.



**Рис. 4.6.2. Порівняння ацетилхолін-індукованого розслаблення в щурів у нормі та з експериментальним діабетом, за умов блокування NO-синтаз.**

Відсоток амплітуди ацетилхолін-індукованого розслаблення блокованого NG-arg (100 мкмоль) у контролі складав 38 %, у той час як, у діабеті він складав 65 %. Використання росіглітазону (5 мкмоль) у діабетичних щурах, могло відновити NO-залежне розслаблення заблоковане NG-arg до значень близьких до контролю.

Водночас аплікація росіглітазону збільшувала амплітуду ацетилхолінового розслаблення, що вказує на те, що ефект росіглітазону в діабетичних щурів так само націлений не на активність або на експресію NO-синтази, а на роботу низхідних елементів цього сигнального шляху в ГМК.

Наступні експерименти показали, що так само, як і в контрольних умовах, використання метиленового синього усувало ефект росіглітазону збільшення амплітуди ацетилхолінового розслаблення в умовах блокування NO синтази за допомогою NG-arg. Останнє вказує на те, що саме за рахунок впливу на гуанілатциклазу відбувається вплив росіглітазону, як у нормі, так і в контролі, що гарно корелює з нашими експериментами по молекулярному докінгу (дивись ст. 96, 99).



### 4.5.3 Внесок KIR в ацетилхолін-індуковане розслаблення в діабеті 2 типу та ефект росіглітазону на цей внесок

Наступним кроком був досліджений ефект KIR компоненти EDHF, на ацетилхолінове розслаблення. Отримані результати свідчать, що, після блокування KIR ми не бачили суттєвого зменшення амплітуди ацетилхолін-індукованого розслаблення, на відміну від контролю, де ця зміна складала 50 %, що вказує на значне інгібування KIR компоненти EDHF в діабеті 2 типу. Окрім того використання росіглітазону суттєво не впливало на це явище (Рис. 4.6.3).

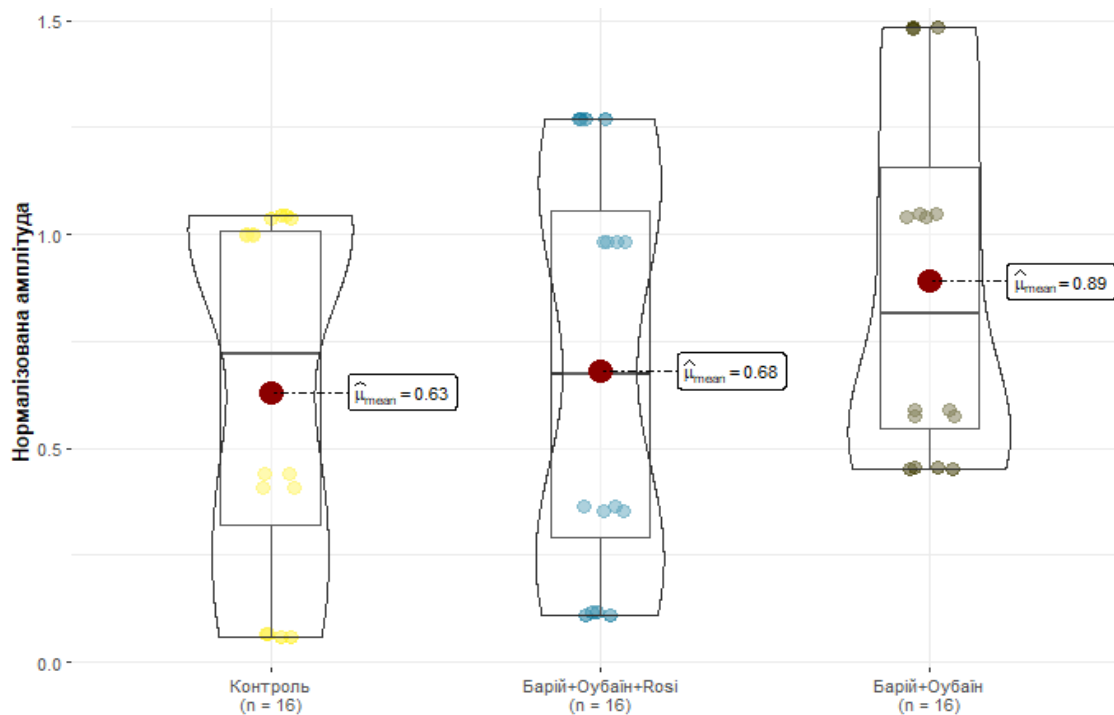


Рис. 4.6.3. Порівняння амплітуд ацетилхолін-індукованого розслаблення фенілефрин-викликаного скорочення сегментів аорти щурів із діабетом у контролі, після використання барію та оубаїну і використання барію, оубаїну та росіглітазону.

Використання  $\text{Ba}^{2+}$  (100 мкмоль) та оубаїну (40 мкмоль) не викликало статистично значущих змін у амплітудах ацетилхолін-індукованого розслаблення смужок аорти діабетичних щурів на відміну від контролю. Використання росіглітазону() не мало суттєвого впливу на це явище.

#### 4.5.4 Внесок ЦОГ- $\frac{1}{2}$ , в ацетилхолін-індуковане розслаблення при діабеті 2 типу

Результати експериментів із блокуванням ЦОГ- $\frac{1}{2}$  індометацином у аорті діабетичного щура показали зниження амплітуди ацетилхолінового розслаблення на  $41\% \pm 9\%$ , що є близьким до значення в нормальних щурів ( $44\%$ ), ймовірно, це вказує на те, що ЦОГ- $\frac{1}{2}$  суттєво не пригнічується при діабеті 2 типу, одночасно й не перебирає на себе компенсаторну функцію. При цьому отримані результати свідчать, що аплікація росіглітазону здатна суттєво збільшити амплітуду ацетилхолінового розслаблення ( $p_{\text{holm}}=0.01$ ) блоковану індометацином (Рис. 4.6.4).

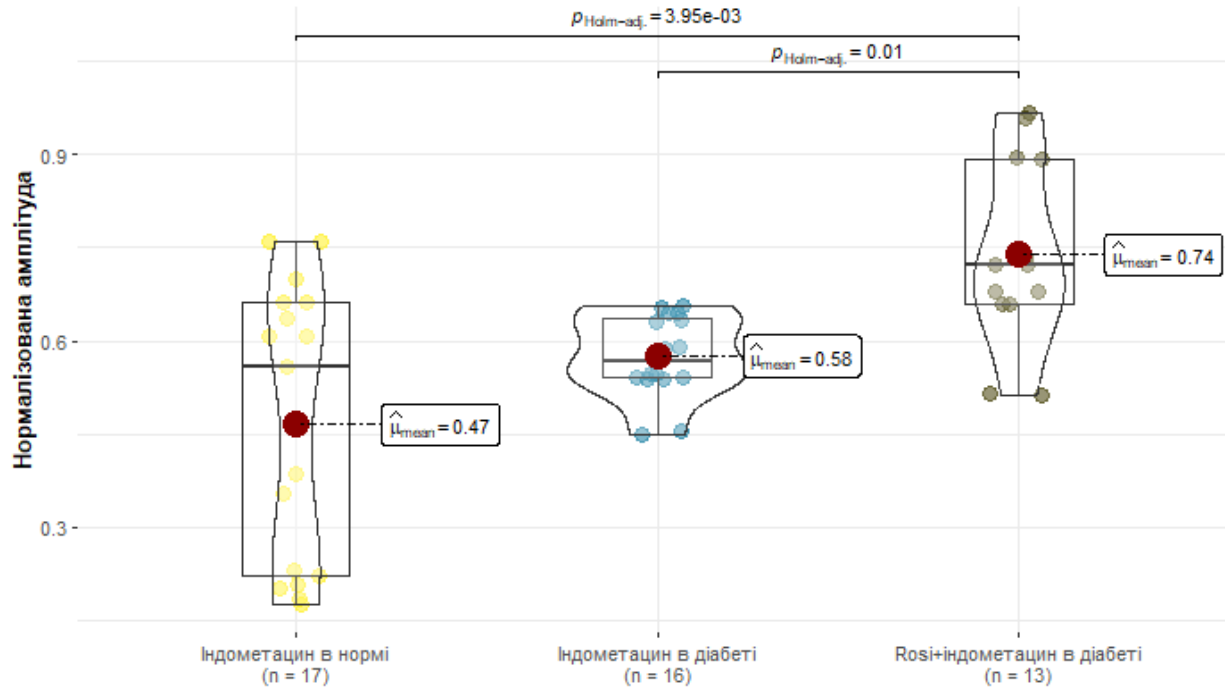


Рис. 4.6.4. Порівняння амплітуд розслаблення на тлі дії індометацину в нормі, діабеті 2 типу та в діабеті 2 типу в присутності росіглітазону.

Частина ацетилхолін-індукованого розслаблення блокована індометацином (1 мкмоль) у нормі, та в діабеті 2 типу, є приблизно рівною  $41\%$  та  $44\%$ , відповідно. Використання росіглітазону (5 мкмоль) збільшувало амплітуду розслаблення, до значень близьких до початкових.

#### 4.5.5 Визначення амплітуд TRPV4-залежного розслаблення в діабетичних щурів

Наші експерименти показали, що в діабетичних щурів амплітуда TRPV4-залежного розслаблення складала  $34\% \pm 9\%$  від максимуму фенілефринного скорочення, що було більше за амплітуду TRPV4-залежного розслаблення в контролі, де вона складала  $25\% \pm 9\%$ , що вказує на зростання важливості TRPV4 у діабеті та його можливу компенсаторну роль. Використання росіглітазону незначно, але статистично достовірно збільшувало ефект TRPV4-залежного розслаблення, що вказує на те, що росіглітазон впливає на експресію/активність TRPV4 або низхідних елементів його сигнального шляху в діабеті (Рис. 4.6.5).

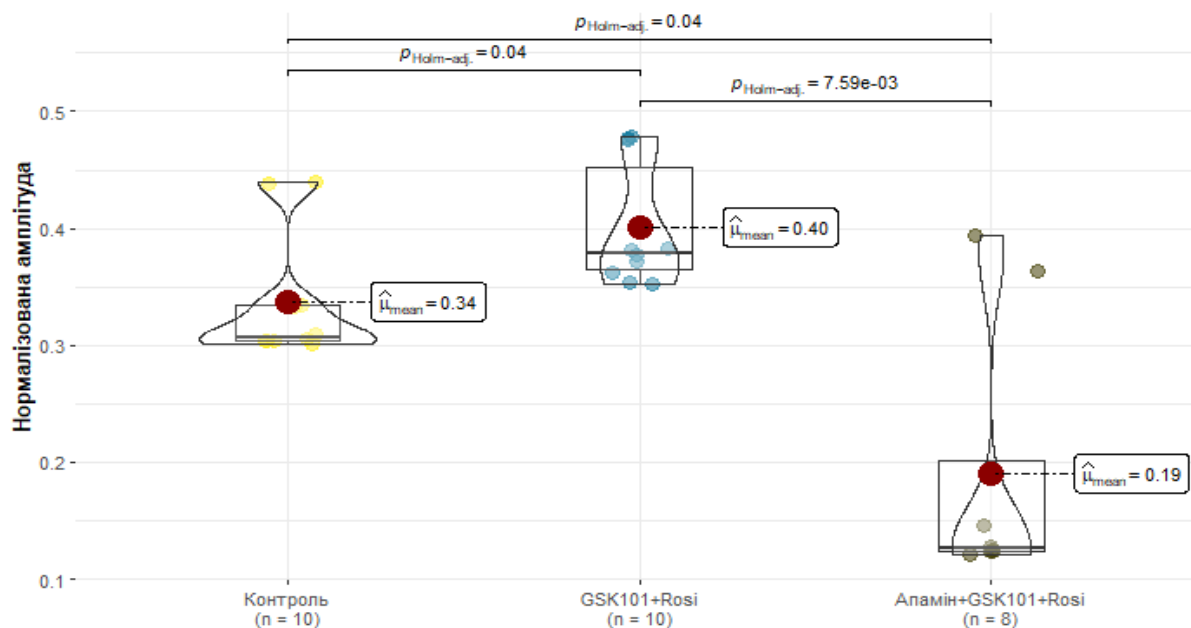
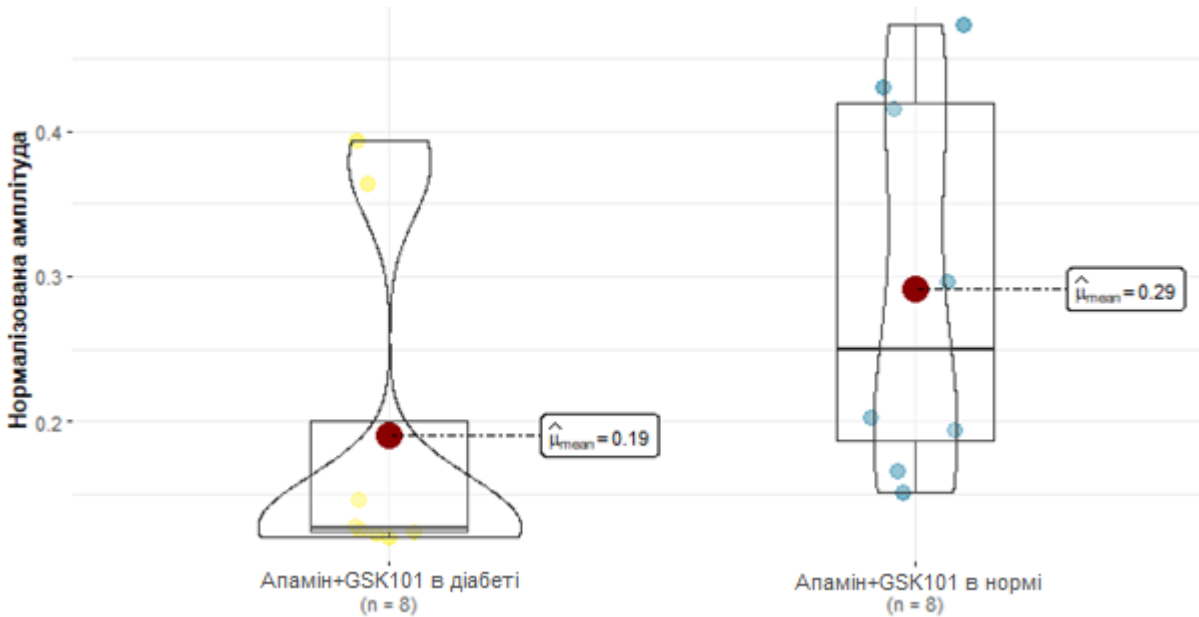


Рис. 4.6.5. Порівняння амплітуд TRPV4-залежного розслаблення фенілефринного скорочення, викликаного GSK101 в діабетичних щурів у контролі, на тлі дії росіглітазону та при сумісній дії росіглітазону й апаміну.

Використання росіглітазону статистично значуще ( $p_{\text{holm}}=0.04$ ,  $n=10$ ) збільшувало амплітуду TRPV4-залежного розслаблення на 9 %, а частина цього розслаблення, блокована апаміном(0.1 мкмоль), складала 70 %.

Також було показано, що застосування апаміну викликало зменшення амплітуди викликаного активатором TRPV4 каналу GSK101 розслаблення на  $69\% \pm 9\%$ , відповідно внесок SK каналів у це розслаблення складає приблизно  $70\%$ , що є більшим за внесок SK у контролі ( $55\%$ ) (Рис. 4.6.6). Ймовірно, це пов'язано зі збільшенням експресії/активності SK каналів у діабеті у якості компенсаторного ефекту або/і зменшення експресії/активності ІК каналів у діабеті.



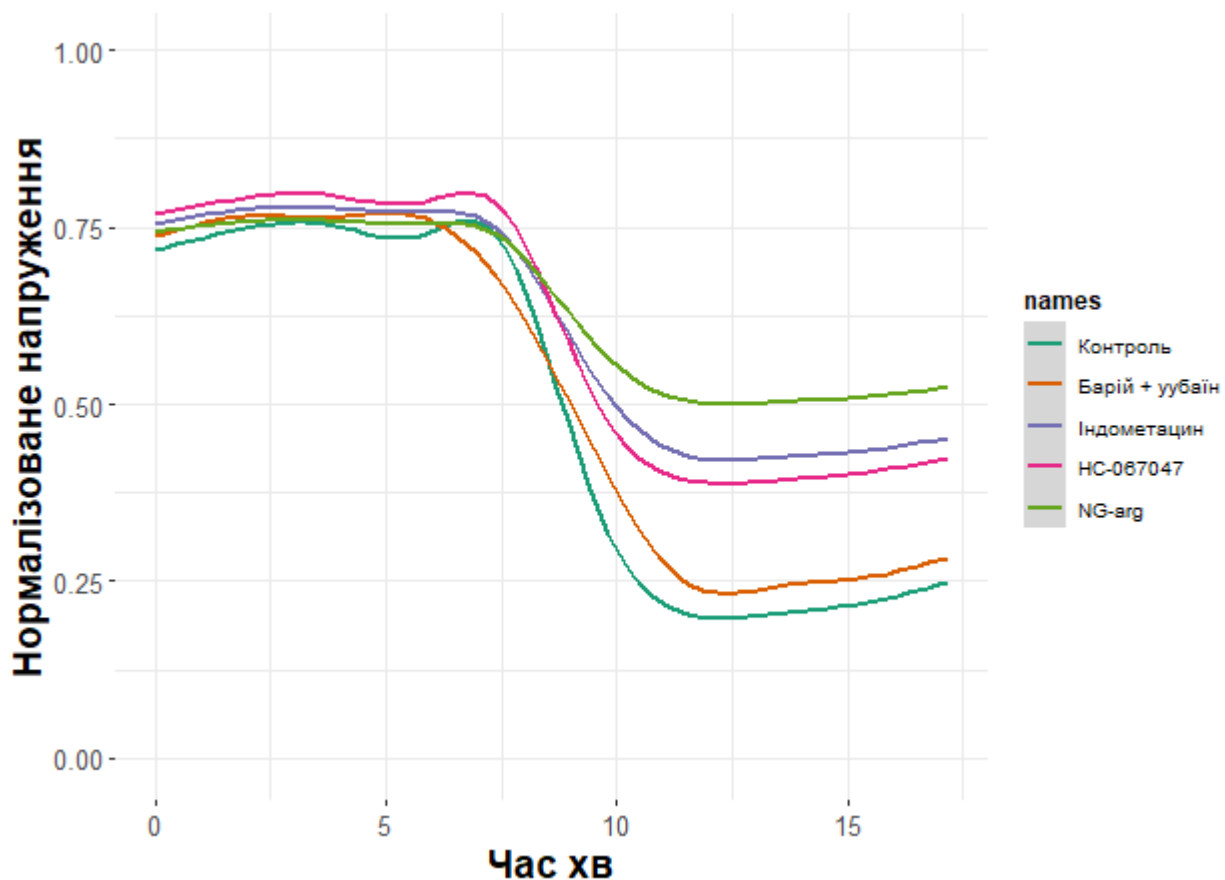
**Рис. 4.6.6. Порівняння амплітуд TRPV4 залежного розслаблення фенілефринного скорочення сегментів аорти щурів, викликаного GSK101 у нормі та за умов експериментального діабету 2 типу.**

У нормі доля TRPV4-залежного розслаблення блокована апаміном складала  $55\%$ , у той час, як у діабеті 2 типу вона зростала до  $70\%$ .

Вищезазначені результати опубліковані в: **Меженський О.Р.**, Філіппов І.Б., Компоненти ендотелійзалежного ацетилхолінового розслаблення грудної аорти щура в діабеті 2 типу. XXI Міжнародна науково конференція «ШЕВЧЕНКІВСЬКА ВЕСНА: ДОСЯГНЕННЯ В НАУКАХ ПРО ЖИТТЯ/ADVANCEMENTS IN LIFE SCIENCES» (Київ 2024).

У підсумку наших експериментів із діабетом 2 типу ми визначили, що загальна амплітуда ацетилхолінового скорочення є меншою на 10 %, блокування KIR зменшує цю амплітуду на <10 %, блокування TRPV4 зменшує амплітуду на 34 %, а блокування функції ЦОГ- $\frac{1}{2}$  на 41 %, у той час, як блокування NO зменшувало амплітуду на 65 % (Рис. 4.6.7).

Вищезазначене вказує на те, що в діабеті 2 типу, KIR функція інгібується, а NO функція виконує компенсаторну роль, у той час, як ЦОГ не зазнає суттєвих змін, а внесок TRPV4 незначно збільшується.



**Рис. 4.6.7. Підсумковий графік із зображенням нормалізованого ацетилхолін-індукованого розслаблення на тлі фенілефрин-залежного скорочення сегментів аорти щурів з експериментальним діабетом 2 типу за різних умов.**

Для графіку були обрані найбільш репрезентативні записи, трейси, для якого були нормалізовані до розслаблення в контролі з використання методу згладжування lowess з фактором = 0.119.

## 5 Аналіз та узагальнення отриманих результатів

### 5.1 Внески компонентів у ацетилхолінове розслаблення

У підсумку наше дослідження з визначення внеску компонентів ацетилхолінового розслаблення показало, що ацетилхолін-індуковане розслаблення аорти щура реалізується через ряд механізмів, що мають різний внесок у цей процес. Розуміння внеску цих факторів є надзвичайно важливим з огляду на вирішальну роль аорти в кровопостачанні органів та буферизації стрибків тиску для захисту менших судин від розриву.

Основним регулятором базального тону аорти щурів є NO, який діє через гуанілатциклазний шлях. Наші результати показують, що блокада NO усуває  $38\% \pm 12\%$  ацетилхолін-індукованого розслаблення, що підкреслює його ключову роль у регуляції базального тону аорти.

На додаток до NO, EDHF має суттєвий вплив на базальний тонус судин і відіграє важливу роль в ацетилхолін-індукованому розслабленні. Блокада KIR-каналів, ключових гравців у поширенні EDHF, інгібує  $50\% \pm 8\%$  амплітуди розслаблення (52, 59, 221–224). EDHF впливає на гладком'язові клітини через різні механізми, що задіюють щілинні з'єднання або/і маючи прямий вплив на мембрану ГМК. Наші дані демонструють, що  $50\% \pm 12\%$  ефекту EDHF опосередковано через щілинні контакти, тоді, як решта діє через KIR-канали на ГМК (59, 225)

Простагландини, беруть участь в ацетилхолін-індукованому розслабленні через активацію протеїнкінази A та її подальшого сигнального шляху (64). Наші результати показують, що інгібування простагландинів шляхом неселективного блокування циклооксигенази  $1/2$  зменшує амплітуду ацетилхолін-індукованого розслаблення на  $44\% \pm 14\%$ .

Останній ідентифікований компонент ацетилхолін-індукованого розслаблення в аорті пов'язаний із  $K_{ATP}$ -каналами і NO-синтазою, які регулюються переваскулярними

сенсорними нервовими закінченнями. Сенсорні нервові закінчення вивільняють субстанцію P і пов'язані з кальцитонін-ген зв'язаним пептидом, що діють як неадренергічні-нехолінергічні вазодилататори (66, 70, 226, 227).

Наші дані вказують на те, що попередня сенсорна денервація капсаїцином усуває останні  $10\% \pm 4\%$  амплітуди ацетилхолін-індукованого розслаблення, демонструючи невеликий, але значний внесок у цей феномен.

Наші дані вказують на те, що функції TRPV4 каналу відповідають за  $25\% \pm 9\%$  ацетилхолін-індукованого розслаблення, здійснюючи вплив, як через сигнальний шлях EDHF, так і через NO (78).

Крім того, базальна активність TRPV4 каналу залучена до такого явища, як міоендотеліальний фідбек, що підкреслює складну роль TRPV4 у регуляції тону аорти (211). Цей феномен мав суттєве значення для оцінки ролі TRPV4 у залученні сигнального шляху EDHF і розуміння його впливу на регуляцію судинного тону.

Також нами було показано, що, близько половини ( $55\% \pm 11\%$ ) розслаблення індукованого TRPV4, може, бути заблоковане за рахунок блокування каналів SK, і відповідно решта  $45\%$  має бути пов'язана з ефектами каналів IK (228, 229).

Складність підсумовування всіх компонентів до  $100\%$  можна пояснити тим, що всі вищезазначені сигнальні шляхи перетинаються і здатні впливати один на одного як, синергетично так і антагоністично. Зокрема, інгібування циклооксигенази 1/2 індометацином має ширші наслідки, ніж просто вплив на простагландиновий сигнальний шлях, де дослідження показали, що індометацин, не впливаючи на рівень експресії iNOS або eNOS, усе ж пригнічує їхню активність через блокування гемоксигенази. Цей подвійний ефект означає, що застосування індометацину впливає не лише, на простагландиновий шлях, але й опосередковано на функцію NO (13, 230).

Отже, частина ацетилхолін-індукованого розслаблення, інгібованого індометацином буде включати внески як NO, так і простагландинових компонентів.

## 5.2 Вплив росіглітазону на ацетилхолінове розслаблення та його компоненти

У ході роботи по дослідженню ефектів PPAR- $\gamma$  ми показали, що активатор цього рецептора росіглітазон здатний впливати на досліджені нами компоненти ацетилхолін-індукованого розслаблення, а саме на сигнальний шлях NO, підсилюючи його на  $36\% \pm 8\%$ , ймовірно, за рахунок впливу на розчину гуанілатциклазу, що показано на експериментах по блокуванню гуанілатциклази метиленовим синім, де ефекту росіглітазону не було помічено (17, 231, 232).

Крім того, було показано, що росіглітазон здатний покращити ЦОГ-залежне розслаблення, повертаючи амплітуду розслаблена знижену за рахунок блокування індометацином до контрольних рівнів (233, 234)

Разом із тим ми показали, що росіглітазон не мав впливу на KIR компоненту EDHF, ніяк не змінюючи амплітуду ацетилхолін-індукованого розслаблення.

Цікавим було спостереження про вплив росіглітазону на потенціал-залежні калієві канали, у вигляді посилення їх функції, що було помічено на реакціях на гіперкалієвий розчин, де росіглітазон збільшував амплітуду скорочення на 32%, що вказує на здатність росіглітазону впливати на потенціалзалежні кальцієві канали. Згідно з літературними даними — росіглітазон у високих концентраціях — 80 мікромоль/л здатний викликати блокування калієвого та кальцієвого струму, що призводить до продовження ефекту потенціалу дії (який пов'язують із негативними ефектами росіглітазону на серцево-судинну систему) (216–218), однак у наших експериментах була використана значно менша концентрація росіглітазону, що, може, вказувати на наявність його ефектів за менших концентрації, ніж було описано раніше та на відмінність ефектів у різних типах тканин, ймовірно, за рахунок експресії різних каналів, або різних ізоформ цих каналів.

Ще одним цікавим спостереженням була диференційна реакція судини на використання росіглітазону у вигляді зміни базального тону. Наші результати



показують, що росіглїтазон викликав, лише, незначне зниження рівнів базального тонусу в проксимальних ділянках, у той час як, у дистальних ділянках це зменшення було більш значним. Наведене спостереження добре корелює з нашими результатами, отриманими після біоінформатичного аналізу транскриптому, про наявність диференційної експресії генів кальцієвих каналів (на які має вплив росіглїтазон), між проксимальною та дистальною частиною, де в дистальній частині їх експресія є суттєво вищою (дивись ст. 69, 70), що, ймовірно, призводило до більш суттєвих змін у відповідь на аплікацію росіглїтазону, які ми спостерігали в нашій роботі.

Також було помічено, що ендотелїйзалежні та ендотелїйнезалежні васкулярні ефекти росіглїтазону можуть мати різну направленість — так в експериментах на смужках із механічно видаленим ендотелїєм було помічено, що у відповідь на застосування росіглїтазону базальний тонус зростав у кожному випадку, у той час, як в експериментах з інтактним ендотелїєм такого не було помічено. Ймовірно, це пов'язано зі здатністю росіглїтазону впливати на NO сигнальний шлях при інтактному ендотелїї, тим самим, ініціюючи, підсилення розслаблюючої функції, а за умов відсутності ендотелїю на перший план, виходить, його здатність блокувати калїєві струми тим самим викликаючи зростання базального тонусу.

### 5.3 Внески компонентів ацетилхолінового розслаблення при діабеті 2 типу та ефект росіглітазону на них

Результати дослідження ацетилхолін-індукованого розслаблення при діабеті 2 типу показали, що регулювання судинних функцій суттєво змінюється при діабеті 2 типу — включаючи функціонування таких сигнальних шляхів, як NO, EDHF, ЦОГ.

Нами було показано знижену здатність судинних смужок діабетичних щурів реагувати на використання ацетилхоліну, де зниження складало 10 % від загальної амплітуди в порівнянні з контролем. Відповідні спостереження добре узгоджуються з літературними даними, які вказують на суттєве зниження васкулярної реактивності в моделі діабету 2 типу. Зниження амплітуди розслаблення, може, бути пов'язаним, як із впливом на сигнальні шляхи, включаючи йонні канали, щілинні контакти, дифузні сигнальні молекули чи елементи внутрішньоклітинного сигнального каскаду, так і на фізичне ремоделювання судини — збільшення її жорсткості, та товщини судинної стінки загалом (235, 236).

Однією з головних змін у васкулярній функції, яка викликається діабетом нами були визначено зменшення внеску EDHF у розслаблення аорти у відповідь на застосування ацетилхоліну. Наші результати показали, що KIR-залежна компонента (блокована  $\text{Ba}^{2+}$  з оубаїном) майже не має внеску в ацетилхолінове розслаблення аорти діабетичного щура (<10 %), що суттєво відрізняється від контролю, де цей внесок складав 55 %. Ймовірно, це пов'язано зі змінами в експресії KIR каналів, в аорті, однак причина та значення для функціонування аорти цих змін є досі нез'ясованими (7, 14, 15, 167, 237, 238). Також наші дослідження показали, що росіглітазон не здатний впливати на KIR компоненту EDHF у діабеті 2 типу.

На відміну від ацетилхолін-індукованого розслаблення, амплітуда TRPV4 залежного розслаблення зростає в діабетичних щурів із 25 % у нормі до 34 % у діабетичних щурів, що, може, вказувати на збільшену активність чи експресію TRPV4

у діабеті, ймовірно, у якості компенсаторної функції. Водночас літературні данні стверджують, що експресія TRPV4 в таких тканинах та органах як, жирова (показано на клітинній лінії), нирки (показано на мишах), сітківка (показано на клітинній лінії), та кишківник зменшується в діабеті 2 типу. Також існують дані, що показують зменшення TRPV4-залежного розслаблення в резистивних судинах, а саме в мезентеріальній артерії. Це вказує на те, що в різних тканинах (та різних видах), вплив діабету на TRPV4 канал, може, відрізнятись. Окрім того вплив діабету на TRPV4 канали, може, залежати від різних чинників (метод індукції діабету, термін, а також етап розвитку діабету (переддіабет, діабет), вид/лінія експериментальних тварин та досліджена тканинах) (163, 191, 239–242).

Також наші результати показують, що застосування росіглітазону значно покращує TRPV4 залежне розслаблення, ймовірно, за рахунок прямого впливу росіглітазону на цей канал. Блокування SK каналів апаміном призводило до зменшення амплітуди TRPV4-залежного розслаблення на 69 %, що є більшим за 55 % у нормі. Дане спостереження вказує на більшу експресію/активність SK каналів у діабеті, або на відповідно меншу експресію чи активність IK каналів. Водночас аналіз літературних джерел показує, що діабет призводить до зниження експресії ізоформ SK каналу 1 та 2 (у мезентеріальній артерій), і навпаки підвищує експресію всіх ізоформ IK каналів (в нирковій та легеневій тканинах). Це вказує на відмінні ефекти діабету 2 типу на різні види тканин та органів (82, 243)

Додаткове цікаве спостереження включало в себе те, що ефект EDHF, що є залученим у TRPV4-залежне розслаблення, усе ж є наявним у діабетичних щурах, хоча спроби виявити його класичне проявлення в ацетилхолін-індукованому розслабленні показали його відсутність. Відповідно до цього спостереження було висунуте припущення, що штучна активація TRPV4 каналу здатна задіяти EDHF в діабетичних щурах, хоча загальний ефект EDHF є інгібованим у діабеті. Це, може, бути пов'язано як, зі зниженою експресією самих KIR каналів, так і за рахунок змінами у їх активності викликаними іншими елементами. Це підтверджується тим, що KIR канали можуть

бути штучно активовані діазоксидом і викликати розслаблення за рахунок гіперполяризації в ендотелії, що співпадає з нашими даними, щодо штучної активації EDHF за рахунок TRPV4 (227, 244, 245).

Наступним елементом ацетилхолінового розслаблення, що зазнає значущих змін у діабеті був газотрансмітер NO. Наші результати показують, що його внесок у амплітуду розслаблення зріс до 65 % з 38 % у контролі. Наразі важко сказати чи є безпосередній внесок NO більшим, лише за рахунок зменшення долі EDHF, чи його безпосередня активність також зростає. Попередні дослідження мають розбіжні висновки щодо цього процесу, де частина досліджень вказує на зменшення біодоступності NO за рахунок впливу активних форм кисню, а частина вказує на відсутність змін у роботі NO (4, 246, 247) Додатково наші результати показали, що використання росіглітазону здатне покращити NO-залежне розслаблення, ймовірно, працюючи через вплив на гуанілатциклазу, що підтверджується експериментам із її блокування метиленовим синім. Оскільки літературні дані стверджують, що росіглітазон не здатний безпосередньо підвищувати рівні експресії гуанілатциклази (та базальні рівні NO), наше припущення полягає в тому, що він здатний впливати на певні сигнальні елементи, що регулюють її активність (215), або безпосередньо зв'язуватися з нею у якості неспецифічного активатора, що було показано в ході молекулярного докінгу.

Також наші експерименти показали, що внесок ЦОГ у ацетилхолінове розслаблення не змінюється порівняно з контролем, що, ймовірно, пов'язано з відсутністю впливів PPAR- $\gamma$  на ЦОГ або її низхідні сигнальні елементи. Однак наші результати показали, що використання росіглітазону здатне покращити ЦОГ-залежне розслаблення. Причина цього ефекту залишається нез'ясованою, однак вона, ймовірно, має бути пов'язаною з впливом на низхідні елементи ЦОГ-залежного сигнального шляху, хоча певні дослідження вказують на те, що використання подібного до росіглітазону препарату піоглітазону здатне збільшувати продукцію простагліциклінів напряду (16).

## 5.4 Неспецифічна активація йонних каналів/сигнальних молекул росіглітазоном

Результати молекулярного докінгу вказують на те, що росіглітазон потенційно здатний неспецифічно зв'язуватися з багатьма різними рецепторами/каналами такими, як потенціалзалежні, кальційзалежні калієві канали, канали вхідного випрямлення, представники родини TRP та потенціалзалежні кальцієві канали. Здатність росіглітазону зв'язуватися із цими каналами була показана в попередніх експериментальних роботах(18, 216–218), що підтверджує загальну валідність результатів проведеного нами молекулярного докінгу.

Також нами було показано, що росіглітазон здатний зв'язуватися з двопородоменими калієвими каналами — TWIK та TRAAK — у низьких концентраціях 6.15 та 11.63 мкмоль/л. Оскільки ця взаємодія не була описана раніше, її валідність ми можемо оцінити, лише за рахунок вторинних чинників. Враховуючи, що поза зв'язування росіглітазону із цими каналами знаходиться на ліганд-зв'язуючому домені, ми можемо припустити, що ефект росіглітазону полягає в модуляції роботи цих каналів.

Здатність росіглітазону взаємодіяти з розчинною гуанілатциклазою була показана для концентрацій в  $\sim 14$  мкмоль/л, та має вторинні підтвердження у вигляді експериментів із блокуванням ефекту росіглітазону за рахунок інгібування гуанілатциклази метиленовим синім. Це спостереження, може, пояснити заявлений у літературі та спостережений нами ефект росіглітазону щодо покращення релаксуючої функції NO у судинній системі (215, 248, 249). Також враховуючи, що росіглітазон зв'язується із гуанілатциклазою на NO-чутливому домені, ми можемо припустити, що він або сам активує гуанілатциклазу, або впливає на чутливість гуанілатциклази до NO.

## 5.5 Диференційна експресія генів компонентів ацетилхолінового розслаблення між проксимальною та дистальною частиною грудної аорти

Отримані нами дані свідчать про градієнт експресії генів між черевною та грудною аортою, що дає переконливе пояснення варіаціям у поведінці аорти в грудному відділі, що були помічені. Незважаючи на існування чіткої анатомічної межі між відділами аорти, наше дослідження підкреслює відсутність функціональної межі між відділами аорти, виявляючи функціональний градієнт між проксимальною і дистальною частинами грудної аорти. Ця розбіжність в експресії, може, пояснювати відмінності в амплітуді ацетилхолін-індукованого розслаблення на фоні фенілефрінового скорочення між сегментами грудної аорти, оскільки KIR канали відіграють важливу роль у розслабленні аорти за рахунок їх впливу на EDHF (59, 225, 250, 251) тоді як, щілинні (міоендотеліальні) контакти впливають на поширення EDHF від ендотелію до ГМК, а, отже, на розслаблення судинної стінки (61, 252).

Окрім KIR, інший калієвий канал — *Kcnk3* (TWIK) — показав незначну ( $LFC=4.03893458$ ,  $p_{adj}=0.067$ ) диференційну експресію, з вищою експресією в проксимальній частині грудної аорти. Цей канал належить до підродини 2-порових калієвих каналів, яка, як відомо, відіграє важливу роль у регуляції мембранного потенціалу спокою через витік йонів  $K^+$  (253). Наші дані не можуть надати чітких результатів щодо диференційної експресії цього каналу, проте це, може, бути важливим для пояснення відмінностей у проксимальному та дистальному відділах аорти.

Інша цікава закономірність пов'язана з диференційною експресією потенціалзалежних кальцієвих каналів, пов'язаних із клітинним збудженням і кальцієвим сигналюванням, що мають вирішальне значення для м'язової скоротливості, які, як ми показали, відіграють роль у регуляції базального тонуусу дистальних сегментів грудної аорти. При цьому потенціалзалежні кальцієві канали

деактивуються гіперполяризацією і, отже, спричиняють менше скорочення, що свідчить про можливий взаємозв'язок між підвищеною експресією KIR і цих каналів у різних ділянках аорти (254–256).

Крім того, результати аналізу диференційної експресії показали підвищену експресію білків компонентів м'язового комплексу (*Myl6*, *Myo7b*, *Arpc1b*) у черевній частині аорти в порівнянні з грудною. Це, може, свідчити про більшу щільність м'язових волокон у дистальних відділах аорти, що впливає на її скоротливу поведінку, та узгоджується з попередніми дослідженнями анатомії аорти.

Наші результати узгоджуються з існуючими літературними даними з анатомії аорти, де проксимальні відділи грудної аорти виконують еластичні функції, діючи як, демпфер проти стрибків артеріального тиску, що підтверджується нижчою міозинізацією та меншою щільністю елементів, відповідальних за розслаблення. На противагу цьому, дистальні відділи відіграють ключову роль у регулюванні кровопостачання органів грудної порожнини завдяки своїм скоротливим властивостям, про що свідчить вищий рівень експресії міозину та більша щільність елементів, що регулюють скорочення та розслаблення.

Аналіз даних РНК секвенування показав не тільки градієнт експресії генів пов'язаних із розслабленням, але й додаткові диференційно експресовані гени, пов'язані з іншими фізіологічними функціями. Показані результати дають цінну інформацію, яка розширює наше розуміння просторових патернів, що керують функціонуванням аорти. Виявлені гени можуть відігравати вирішальну роль у формуванні складної динаміки функціонування аорти в різних її регіонах, що роблять значний внесок у наше розуміння судинної динаміки.

## 6 Висновки

У нашій роботі методом тензометрії було визначено внески компонентів ацетилхолін-індукованого розслаблення грудної аорти щура, в експериментальному діабеті та в контролі, а також визначенні основні мішені впливу активації PPAR- $\gamma$ . Методом молекулярного докінгу були визначені неспецифічні ефекти активатора PPAR- $\gamma$  росіглітазону, а методом інтегративного аналізу даних РНК секвенування були виявлені патерни

1. Був показаний патерн диференційної експресії та функціональний градієнт між проксимальною та дистальною частиною грудної аорти. Було показано, вищу експресію та вищий функціональний внесок KIR каналів та потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу в дистальній частині грудної аорти. Також було показано, вищу експресію компонентів м'язового комплексу, у дистальних частинах грудної аорти.
2. Нами було показано, що в нормі внески NO, ЦОГ, EDHF та нехолінергічних неадренергічних нейромедіаторів у ацетилхолін-індуковане розслаблення складають 38 %, 31 %, 50 %, та 9 %, відповідно. Нами було показано, що 50 % EDHF залежить від поширення через міоендотеліальні контакти, та 50 % від KIR каналів на ГМК, що активуються калієм. Також нами було показано, що внесок TRPV4 у ацетилхолінове розслаблення складає 25 %. Розподіл внесків кальцій-залежних калієвих каналів у TRPV4-залежне розслаблення в нормі вказав на рівні внески IK та SK каналів (50 % та 50 %).
3. Використання росіглітазону не впливало на внесок KIR компоненти EDHF у ацетилхолін-індуковане розслаблення, однак збільшувало внески NO та ЦОГ-1/2 залежних компонент, зміщуючи рівновагу в бік метаболічних процесів. Ефект росіглітазону був зумовлений впливом на активність гуанілатциклази, що було показано відсутністю ефекту росіглітазону на тлі аплікації метиленового синього. Було показано, що росіглітазон збільшував, амплітуду GSK101-



індукованого розслаблення на тлі фенілефрин-викликаного скорочення на 9 %, при інтактному ендотелії в порівнянні з контролем. Вплив росіглітазону на базальний тонус аорти мав відмінний просторовий характер: у дистальних ділянках грудної аорти вплив був сильнішим, ніж у проксимальних. Також було показано, що вплив росіглітазону має як ендотелій-залежний ефект, що викликав зменшення базального тону, та ендотелій-незалежний ефект, що викликав зростання базального тону. Ендотелій-незалежні ефекти, ймовірно, були пов'язані з впливом росіглітазону на потенціал-залежні кальцієві канали L типу ГМК, що було показано за рахунок впливу росіглітазону на амплітуду скорочення викликаного гіперкалієвим розчином Кребса.

4. Методом молекулярного докінгу було виявлено неспецифічні ефекти росіглітазону, а саме: передбачена можливість зв'язуватися з двопородоменими калієвими каналами TWIK і TRAAK, та TRPV4 каналами, а також розчинною гуанілатциклазою. Була передбачена здатність росіглітазону зв'язуватися з TRPV4 каналом у концентрації в 45 мікромоль/л, ймовірно, модулюючи його роботу. З двопородоменими каналами TWIK та TRAAK, була передбачена здатність зв'язуватися в концентраціях 6 та 12 мікромоль/л відповідно. Також було передбачено, що росіглітазон здатний зв'язуватися з розчинною гуанілатциклазою в концентрації 4 мікромоль/л у сенсорному домені, активуючи її напряму або, модулюючи її роботу, що є близьким до використаної нами концентрації.
5. За умов діабету 2 типу змінюються внески компонентів ацетилхолін-індукованого розслаблення, а використання росіглітазону зміщує рівновагу в бік метаболічних процесів, так само, як у нормі. Внесок NO у діабеті 2 типу стає більшим, та досягає 64 %, також використання росіглітазону збільшувало цей внесок. Внесок ЦОГ-1/2 у діабеті не змінюється відносно норми, однак використання росіглітазону здатне збільшувати його внесок. Ефект EDHF зменшується до <10 %. Блокування каналу TRPV4, зменшувало амплітуду

ацетилхолінового з нормою. Розподіл внесків кальційзалежних калієвих каналів у TRPV4 залежне розслаблення змінювався в аорті діабетичних щурів порівняно з нормою та складав 70 % для SK каналів, та 30 % для ІК каналів, відповідно.

## 7 Список використаної літератури

1. **Liu Z, Khalil RA.** Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochem Pharmacol* 153: 91–122, 2018. doi: 10.1016/J.BCP.2018.02.012.
2. **Humphrey JD.** Vascular adaptation and mechanical homeostasis at tissue, cellular, and sub-cellular levels. *Cell Biochem Biophys* 50: 53–78, 2008. doi: 10.1007/S12013–007–9002–3.
3. **Ameer OZ, Salman IM, Alwadi AY, Ouban A, Abu-Owaimer FM, AlSharari SD, Bukhari IA.** Regional functional and structural abnormalities within the aorta as a potential driver of vascular disease in metabolic syndrome. *Exp Physiol* 106: 771–788, 2021. doi: 10.1113/EP089213.
4. **Ibrahim MA, Kanzaki T, Yamagata SI, Satoh N, Ueda S.** Effect of diabetes on aortic nitric oxide synthesis in spontaneously hypertensive rats; does captopril modulate this effect? *Life Sci* 77: 1003–1014, 2005. doi: 10.1016/J.LFS.2005.02.010.
5. **Laurindo FRM, Liberman M, Fernandes DC, Leite PF.** Endothelium-Dependent Vasodilation: Nitric Oxide and Other Mediators.
6. **Novakovic A, Gojkovic-Bukarica L, Peric M, Nezic D, Djukanovic B, Markovic-Lipkovski J, Heinle H.** The Mechanism of Endothelium-Independent Relaxation Induced by the Wine Polyphenol Resveratrol in Human Internal Mammary Artery. *J Pharmacol Sci* 101: 85–90, 2006. doi: 10.1254/JPHS.FP0050863.
7. **Akther F, Razan R, Graham JL, Stanhope KL, Havel PJ, Rahimian R.** Role of EDHF in Potentiation of ACh-induced Relaxation of Aorta in Male UC Davis Type 2 Diabetes Mellitus (UCD-T2DM) Rat: Sex Specific Responses. *FASEB J* 33: 527.19–527.19, 2019. doi: 10.1096/FASEBJ.2019.33.1\_SUPPLEMENT.527.19.
8. **Gojkovic-Bukarica L, Novakovic A, Kanjuh V, Bumbasirevic M, Lesic A, Heinle H.** A Role of Ion Channels in the Endothelium-Independent Relaxation of Rat Mesenteric Artery Induced by Resveratrol. *J Pharmacol Sci* 108: 124–130, 2008. doi:

10.1254/JPHS.08128FP.

9. **Miehe S, Crause P, Schmidt T, Löhn M, Kleemann HW, Licher T, Dittrich W, Rütten H, Strübing C.** Inhibition of diacylglycerol-sensitive TRPC channels by synthetic and natural steroids. *PLoS One* 7, 2012. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0035393.
10. **Park J II, Shin CY, Lee YW, Huh IH, Sohn UD.** Endothelium-dependent sensory non-adrenergic non-cholinergic vasodilatation in rat thoracic aorta: involvement of ATP and a role for NO. *J Pharm Pharmacol* 52: 409–416, 2000. doi: 10.1211/0022357001774165.
11. **Park J II, Shin CY, Lee YW, Huh IH, Sohn UD.** Endothelium-dependent Sensory Non-adrenergic Non-cholinergic Vasodilatation in Rat Thoracic Aorta: Involvement of ATP and a Role for NO. *J Pharm Pharmacol* 52: 409–416, 2010. doi: 10.1211/0022357001774165.
12. **Ahluwalia A, Cellek S.** Regulation of the cardiovascular system by non-adrenergic non-cholinergic nerves. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6: 74–79, 1997. doi: 10.1097/00041552-199701 MJH-00014.
13. **Nagappan AS, Varghese J, Pranesh GT, Jeyaseelan V, Jacob M.** Indomethacin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase in the rat kidney: possible role of this effect in the pathogenesis of indomethacin-induced renal damage. *Chem Biol Interact* 221: 77–87, 2014. doi: 10.1016/J.CBI.2014.07.014.
14. **Park Y, Capobianco S, Gao X, Falck JR, Dellsperger KC, Zhang C.** Role of EDHF in type 2 diabetes-induced endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, 2008. doi: 10.1152/AJPHEART.01261.2007.
15. **Malakul W, Thirawarapan S, Suvitayavat W, Woodman OL.** Type 1 diabetes and hypercholesterolaemia reveal the contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor to endothelium-dependent relaxation of the rat aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35: 192–200, 2008. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04811.x.
16. **Hernanz R, Martín Á, Pérez-Girón J V., Palacios R, Briones AM, Miguel M,**

- Salaices M, Alonso MJ.** Pioglitazone treatment increases COX–2-derived prostacyclin production and reduces oxidative stress in hypertensive rats: role in vascular function. *Br J Pharmacol* 166: 1303–1319, 2012. doi: 10.1111/J.1476–5381.2012.01825.X.
17. **Betz B, Schneider R, Kress T, Schick MA, Wanner C, Sauvant C.** Rosiglitazone Affects Nitric Oxide Synthases and Improves Renal Outcome in a Rat Model of Severe Ischemia/Reperfusion Injury. *PPAR Res* 2012: 12, 2012. doi: 10.1155/2012/219319.
  18. **Majeed Y, Bahnasi Y, Seymour VAL, Wilson LA, Milligan CJ, Agarwal AK, Sukumar P, Naylor J, Beech DJ.** Rapid and contrasting effects of rosiglitazone on transient receptor potential TRPM3 and TRPC5 channels. *Mol Pharmacol* 79: 1023–1030, 2011. doi: 10.1124/MOL.110.069922.
  19. **Sonneveld R, Hoenderop JG, Isidori AM, Henique C, Dijkman HB, Berden JH, Tharaux PL, Van Der Vlag J, Nijenhuis T.** Sildenafil prevents podocyte injury via PPAR-g-mediated TRPC6 inhibition. *J Am Soc Nephrol* 28: 1491–1505, 2017. doi: 10.1681/ASN.2015080885.
  20. **Xue C, Gong J, Guo Y, Yin J, He X, Huang H, Zhou X, Zhao J.** Oxygenized low density lipoprotein down-regulates the TRPV4 protein expression of macrophage through activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Minerva Med* 108: 1–12, 2017. doi: 10.23736/S0026–4806.16.04645–0.
  21. **Gao S, Hua B, Liu Q, Liu H, Li W, Li H.** Role of peroxisome proliferators-activated receptor-gamma in advanced glycation end product-mediated functional loss of voltage-gated potassium channel in rat coronary arteries. *BMC Cardiovasc Disord* 20: 1–11, 2020. doi: 10.1186/S12872–020–01613-Y/FIGURES/6.
  22. **Boerman EM, Sen S, Shaw RL, Joshi T, Segal SS.** Gene Expression Profiles of Ion Channels and Receptors in Mouse Resistance Arteries: Effects of Cell Type, Vascular Bed and Age. *Microcirculation* 25: e12452, 2018. doi: 10.1111/MICC.12452.
  23. **Oyekan A.** PPARs and their effects on the cardiovascular system. *Clin Exp Hypertens* 33: 287–293, 2011. doi: 10.3109/10641963.2010.531845.
  24. **Ketsawatsomkron P, Sigmund CD.** Molecular Mechanisms Regulating Vascular

- Tone by PPAR $\gamma$ . *Curr Opin Nephrol Hypertens* 24: 123, 2015. doi: 10.1097/MNH.0000000000000103.
25. **Fang S, Sigmund CD.** PPAR $\gamma$  and RhoBTB1 in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 29 Lippincott Williams and Wilkins: 161–170, 2020.
  26. **Kobayashi N, Ohno T, Yoshida K, Fukushima H, Mamada Y, Nomura M, Hirata H, MacHida Y, Shinoda M, Suzuki N, Matsuoka H.** Cardioprotective mechanism of telmisartan via PPAR- $\gamma$ -eNOS pathway in dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Am J Hypertens* 21: 576–581, 2008. doi: 10.1038/ajh.2008.27.
  27. **Wilhelm EA, Jesse CR, Bortolatto CF, Barbosa NB V, Nogueira CW.** Evidence of the involvement of K<sup>+</sup> channels and PPAR  $\gamma$  receptors in the antidepressant-like activity of diphenyl diselenide in mice. *J Pharm Pharmacol* 62: 1121–1127, 2010. doi: 10.1111/j.2042–7158.2010.01132.x.
  28. **Shahoud JS, Miao JH, Bolla SR.** Anatomy, Thorax, Heart Aorta [Online]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538140/> [17 Dec. 2023].
  29. **White HJ, Bordes SJ, Borger J.** Anatomy, Abdomen and Pelvis: Aorta [Online]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537319/> [17 Dec. 2023].
  30. **di Gioia CRT, Ascione A, Carletti R, Giordano C.** Thoracic Aorta: Anatomy and Pathology. *Diagnostics* 2023, Vol 13, Page 2166 13: 2166, 2023. doi: 10.3390/DIAGNOSTICS13132166.
  31. **Oloyo AK, Elias SO, Sofola OA.** Differential responses to endothelial-dependent relaxation of the thoracic and abdominal aorta from male sprague-dawley rats [Online]. *Niger J Physiol Sci* 27: 117–122, 2012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23652224/> [19 Dec. 2023].
  32. **ZYGMUNT PM, RYMAN T, HÖGESTÄTT ED.** Regional differences in endothelium-dependent relaxation in the rat: contribution of nitric oxide and nitric oxide-independent mechanisms. *Acta Physiol Scand* 155: 257–266, 1995. doi: 10.1111/J.1748–1716.1995.TB09972.X.
  33. **Guo DC, Papke CL, He R, Milewicz DM.** Pathogenesis of thoracic and abdominal

- aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci* 1085: 339–352, 2006. doi: 10.1196/ANNALS.1383.013.
34. **Wall VZ, Bornfeldt KE.** Arterial smooth muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34: 2175–2179, 2014. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304441.
  35. **Michiels C.** Endothelial cell functions [Online]. *J Cell Physiol* 196: 430–443, 2003. <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.10333> [26 Mar. 2020].
  36. **Félétou M.** The Endothelium [Online]. Morgan & Claypool Life Sciences. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21850763> [11 Mar. 2020].
  37. **Hu Y, Xu Q.** Adventitial biology: differentiation and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 1523–1529, 2011. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.221176.
  38. **Stenmark KR, Yeager ME, El Kasmi KC, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya E V., Li M, Riddle SR, Frid MG.** The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function [Online]. 75, 2013. /pmc/articles/PMC3762248/ [14 Jan. 2020].
  39. **Mazurek R, Dave JM, Chandran RR, Misra A, Sheikh AQ, Greif DM.** Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease [Online]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28212800/> [14 Feb. 2020].
  40. **Xu J, Shi GP.** Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases [Online]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25045854/> [5 May 2020].
  41. **Wheeler JB, Jones JA, Ikonomidis JS.** Aortic extra cellular matrix (ECM) remodeling.
  42. **Phillippi JA.** On vasa vasorum: A history of advances in understanding the vessels of vessels. *Sci Adv* 8: 6364, 2022. doi: 10.1126/SCIADV.ABL6364.
  43. **Majesky MW, Dong XR, Høglund V, Mahoney WM, Daum G.** The adventitia: A dynamic interface containing resident progenitor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 NIH Public Access: 1530–1539, 2011.
  44. **Prabhakar NR.** O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> Detection by the Carotid and Aortic Bodies.
  45. **Sandoo A, Veldhuijzen van Zanten JJC., Metsios GS, Carroll D, Kitas GD.** The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *Open Cardiovasc Med J* 4:

- 302–312, 2015. doi: 10.2174/1874192401004010302.
46. **Kellogg DL, Zhao JL, Coey U, Green J V.** Acetylcholine-induced vasodilation is mediated by nitric oxide and prostaglandins in human skin. *J Appl Physiol* 98: 629–632, 2005. doi: 10.1152/JAPPLPHYSIOL.00728.2004/ASSET/IMAGES/LARGE/ZDG0020535920001.JPEG.
  47. **Durand MJ, Gutterman DD.** Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. *Microcirculation* 20 NIH Public Access: 239–247, 2013.
  48. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** Blood Vessels and Endothelial Cells [Online]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26848/> [21 Apr. 2024].
  49. **Chatterjee S, Fisher AB.** Mechanotransduction in the Endothelium: Role of Membrane Proteins and Reactive Oxygen Species in Sensing, Transduction, and Transmission of the Signal with Altered Blood Flow. *Antioxid Redox Signal* 20: 899, 2014. doi: 10.1089/ARS.2013.5624.
  50. **Li S, Xu Z, Wang Y, Chen L, Wang X, Zhou Y, Lei D, Zang G, Wang G.** Recent advances of mechanosensitive genes in vascular endothelial cells for the formation and treatment of atherosclerosis. *Genes Dis* 11: 101046, 2024. doi: 10.1016/J.GENDIS.2023.06.016.
  51. **Wilson D.** Vascular smooth muscle structure and function. In: *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*. University of Adelaide Press, 2011, p. 13–24.
  52. **Nilius B, Droogmans G.** Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* 81 American Physiological Society: 1415–1459, 2001.
  53. **Cheng J, Wen J, Wang N, Wang C, Xu Q, Yang Y.** Ion Channels and Vascular Diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39: E146–E156, 2019. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312004.



54. **Amberg GC, Navedo MF.** Calcium Dynamics in Vascular Smooth Muscle. *Microcirculation* 20: 281–289, 2013. doi: 10.1111/micc.12046.
55. **Volz KS, Jacobs AH, Chen HI, Poduri A, McKay AS, Riordan DP, Kofler N, Kitajewski J, Weissman I, Red-Horse K.** Pericytes are progenitors for coronary artery smooth muscle. *Elife* 4, 2015. doi: 10.7554/eLife.10036.
56. **Rapoport RM, Draznin MB, Murad F.** Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nat* 1983 3065939 306: 174–176, 1983. doi: 10.1038/306174a0.
57. **Van de Voorde J, Cuvelier C, Leusen I.** Endothelium-dependent relaxation effects in aorta from hypertensive rats. *Arch Int Physiol Biochim* 92, 1984. doi: 10.3109/13813458409071111.
58. **Triggle C, Ceroni L, Jiang Y, Wiehler W, Ellis A, Ding H.** Connexin, BK, IK, and SK expression and EDHF in mouse mesenteric vasculature. *FASEB J* 20: A1175–A1175, 2006. doi: 10.1096/FASEBJ.20.5.A1175-C.
59. **Jackson WF.** Boosting the signal: Endothelial inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Microcirculation* 24 Wiley Blackwell: 2017.
60. **Behringer EJ, Hakim MA.** Functional interaction among KCa and TRP channels for cardiovascular physiology: Modern perspectives on aging and chronic disease. *Int. J. Mol. Sci.* 20 MDPI AG: 2019.
61. **Schmidt K, de Wit C.** Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor and Myoendothelial Coupling: The in vivo Perspective. *Front Physiol* 11: 602930, 2020. doi: 10.3389/FPHYS.2020.602930/BIBTEX.
62. **Chen K, Pittman RN, Popel AS.** Nitric Oxide in the Vasculature: Where Does It Come From and Where Does It Go? A Quantitative Perspective. *Antioxid Redox Signal* 10: 1185, 2008. doi: 10.1089/ARS.2007.1959.
63. **Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS.** Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci* 129: 83–94, 2015. doi: 10.1016/J.JPHS.2015.09.002.
64. **Hristovska AM, Rasmussen LE, Hansen PBL, Nielsen SS, Nüsing RM, Narumiya**

- S, Vanhoutte P, Skøtt O, Jensen BL.** Prostaglandin E2 Induces Vascular Relaxation by E-Prostanoid 4 Receptor-Mediated Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Hypertension* 50: 525–530, 2007. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.088948.
65. **Zou F, Li Y, Zhang S, Zhang J.** DP1 (Prostaglandin D2Receptor 1) Activation Protects Against Vascular Remodeling and Vascular Smooth Muscle Cell Transition to Myofibroblasts in Angiotensin II–Induced Hypertension in Mice. *Hypertension* 79: 1203–1215, 2022. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17584.
66. **Argunhan F, Brain SD.** The Vascular-Dependent and -Independent Actions of Calcitonin Gene-Related Peptide in Cardiovascular Disease. *Front Physiol* 13, 2022. doi: 10.3389/FPHYS.2022.833645/FULL.
67. **Gonzales RJ, Kanagy NL.** Endothelium-Independent Relaxation of Vascular Smooth Muscle by 17 $\beta$ -Estradiol. <https://doi.org/10.1177/107424849900400404> 4: 227–234, 1999. doi: 10.1177/107424849900400404.
68. **Zhou ZY, Zhao WR, Shi WT, Xiao Y, Ma ZL, Xue JG, Zhang LQ, Ye Q, Chen XL, Tang JY.** Endothelial-dependent and independent vascular relaxation effect of tetrahydropalmatine on rat aorta. *Front Pharmacol* 10: 432263, 2019. doi: 10.3389/FPHAR.2019.00336/BIBTEX.
69. **Aalkjaer C, Nilsson H, De Mey JGR.** Sympathetic and sensory-motor nerves in peripheral small arteries. *Physiol Rev* 101: 495–544, 2021. doi: 10.1152/PHYSREV.00007.2020.
70. **Wilkinson JD, Kendall DA, Ralevic V.**  $\Delta$  9-Tetrahydrocannabinol inhibits electrically-evoked CGRP release and capsaicin-sensitive sensory neurogenic vasodilatation in the rat mesenteric arterial bed. *Br J Pharmacol* 152: 709–716, 2007. doi: 10.1038/SJ.BJP.0707448.
71. **Earley S, Brayden JE.** Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiol Rev* 95: 645–690, 2015. doi: 10.1152/physrev.00026.2014.
72. **Heller S, O’Neil R.** Molecular Mechanisms of TRPV4 Gating. CRC Press/Taylor & Francis, 2006, p. 113–124.

73. **Darby WG, Potocnik S, Ramachandran R, Hollenberg MD, Woodman OL, McIntyre P.** Shear stress sensitizes TRPV4 in endothelium-dependent vasodilatation. *Pharmacol Res* 133: 152–159, 2018. doi: 10.1016/j.phrs.2018.05.009.
74. **Köhler R, Hoyer J.** Role of TRPV4 in the Mechanotransduction of Shear Stress in Endothelial Cells. CRC Press/Taylor & Francis, 2006, p. 377–388.
75. **Nilius B, Voets T.** The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO Rep.* 14 Wiley-VCH Verlag: 152–163, 2013.
76. **Garrido R, Bastos A, De Almeida A, Elvas JP.** Prediction of Road Accident Severity Using the Ordered Probit Model. *Transp Res Procedia* 3: 214–223, 2014. doi: 10.1016/J.TRPRO.2014.10.107.
77. **Wen L, Wen YC, Ke GJ, Sun SQ, Dong K, Wang L, Liao RF.** TRPV4 regulates migration and tube formation of human retinal capillary endothelial cells. *BMC Ophthalmol* 18: 38, 2018. doi: 10.1186/s12886-018-0697-2.
78. **Filosa JA, Yao X, Rath G.** TRPV4 and the regulation of vascular tone. *J Cardiovasc Pharmacol* 61: 113–119, 2013. doi: 10.1097/FJC.0b013e318279ba42.
79. **Baylie RL, Brayden JE.** TRPV channels and vascular function. *Acta Physiol.* 203 NIH Public Access: 99–116, 2011.
80. **Song Y, Zhan L, Yu M, Huang C, Meng X, Ma T, Zhang L, Li J.** TRPV4 Channel Inhibits TGF- $\beta$ 1-Induced Proliferation of Hepatic Stellate Cells. *PLoS One* 9: e101179, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0101179.
81. **Kim SW, Ehrman J, Ahn MR, Kondo J, Lopez AAM, Oh YS, Kim XH, Crawley SW, Goldenring JR, Tyska MJ, Rericha EC, Lau KS.** Shear stress induces noncanonical autophagy in intestinal epithelial monolayers. *Mol Biol Cell* 28: 3043–3056, 2017. doi: 10.1091/mbc.E17-01-0021.
82. **Li Y, Hu H, Butterworth MB, Tian J Bin, Zhu MX, O’Neil RG.** Expression of a diverse array of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (SK1/3, IK1, BK) that functionally couple to the mechanosensitive TRPV4 channel in the collecting duct system of kidney. *PLoS One* 11, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0155006.

83. **Li H, Kan H, He C, Zhang X, Yang Z, Jin J, Zhang P, Ma X.** TRPV4 activates cytosolic phospholipase A2 via Ca<sup>2+</sup>-dependent PKC/ERK1/2 signalling in controlling hypertensive contraction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 45: 908–915, 2018. doi: 10.1111/1440–1681.12959.
84. **Goedicke-Fritz S, Kaistha A, Kacik M, Markert S, Hofmeister A, Busch C, Bänfer S, Jacob R, Grgic I, Hoyer J.** Evidence for functional and dynamic microcompartmentation of Cav-1/TRPV4/K (Ca) in caveolae of endothelial cells. *Eur J Cell Biol* 94: 391–400, 2015. doi: 10.1016/J.EJCB.2015.06.002.
85. **Sertznig P, Reichrath J.** Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in dermatology: Challenge and promise. *Dermatoendocrinol.* 3 Landes Bioscience: 130–135, 2011.
86. **Laudet V, Gronemeyer H.** PPAR. In: *The Nuclear Receptor FactsBook*. Elsevier, 2002, p. 141–158.
87. **Ricote M, Glass CK.** PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim. Biophys. Acta — Mol. Cell Biol. Lipids* 1771 NIH Public Access: 926–935, 2007.
88. **Pawlak M, Baugé E, Bourguet W, De Bosscher K, Lalloyer F, Tailleux A, Lebherz C, Lefebvre P, Staels B.** The transrepressive activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is necessary and sufficient to prevent liver fibrosis in mice. *Hepatology* 60: 1593–1606, 2014. doi: 10.1002/hep.27297.
89. **Kang Z, Fan R.** PPAR $\alpha$  and NCOR/SMRT corepressor network in liver metabolic regulation. *FASEB J* 34: 8796–8809, 2020. doi: 10.1096/fj.202000055RR.
90. **Kwon KA, Yun J, Oh SY, Seo BG, Lee S, Lee JH, Kim SH, Choi HJ, Roh MS, Kim HJ.** Clinical significance of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and TRAP220 in patients with operable colorectal cancer. *Cancer Res Treat* 48: 198–207, 2016. doi: 10.4143/crt.2015.024.
91. **Gearing KL, Gottlicher M, Teboul M, Widmark E, Gustafsson JA.** Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1440–1444, 1993. doi: 10.1073/pnas.90.4.1440.

92. **Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM, Klier SA, Milburn M V.** Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator- activated receptors. *Mol Cell* 3: 397–403, 1999. doi: 10.1016/S1097–2765 (00)80467–0.
93. **Rangwala SM, Lazar MA.** Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* 25 Trends Pharmacol Sci: 331–336, 2004.
94. **Mandard S, Müller M, Kersten S.** Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  target genes. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 393–416, 2004.
95. **Ardlie KG, DeLuca DS, Segrè A V., Sullivan TJ, Young TR, Gelfand ET, Trowbridge CA, Maller JB, Tukiainen T, Lek M, Ward LD, Kheradpour P, Iriarte B, Meng Y, Palmer CD, Esko T, Winckler W, Hirschhorn JN, Kellis M, MacArthur DG, Getz G, Shabalin AA, Li G, Zhou YH, Nobel AB, Rusyn I, Wright FA, Lappalainen T, Ferreira PG, Ongen H, Rivas MA, Battle A, Mostafavi S, Monlong J, Sammeth M, Melé M, Reverter F, Goldmann JM, Koller D, Guigó R, McCarthy MI, Dermitzakis ET, Gamazon ER, Im HK, Konkashbaev A, Nicolae DL, Cox NJ, Flutre T, Wen X, Stephens M, Pritchard JK, Tu Z, Zhang B, Huang T, Long Q, Lin L, Yang J, Zhu J, Liu J, Brown A, Mestichelli B, Tidwell D, Lo E, Salvatore M, Shad S, Thomas JA, Lonsdale JT, Moser MT, Gillard BM, Karasik E, Ramsey K, Choi C, Foster BA, Syron J, Fleming J, Magazine H, Hasz R, Walters GD, Bridge JP, Miklos M, Sullivan S, Barker LK, Traino HM, Mosavel M, Siminoff LA, Valley DR, Rohrer DC, Jewell SD, Branton PA, Sobin LH, Barcus M, Qi L, McLean J, Hariharan P, Um KS, Wu S, Tabor D, Shive C, Smith AM, Buia SA, Undale AH, Robinson KL, Roche N, Valentino KM, Britton A, Burges R, Bradbury D, Hambright KW, Seleski J, Korzeniewski GE, Erickson K, Marcus Y, Tejada J, Taherian M, Lu C, Basile M, Mash DC, Volpi S, Struewing JP, Temple GF, Boyer J, Colantuoni D, Little R, Koester S, Carithers LJ, Moore HM, Guan P, Compton C, Sawyer SJ, Demchok JP, Vaught JB, Rabiner CA, Lockhart.** The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in

- humans. *Science* (80-) 348: 648–660, 2015. doi: 10.1126/science.1262110.
96. **Cronet P, Petersen JFW, Folmer R, Blomberg N, Sjöblom K, Karlsson U, Lindstedt EL, Bamberg K.** Structure of the PPAR $\alpha$  and - $\gamma$  ligand binding domain in complex with AZ 242; ligand selectivity and agonist activation in the PPAR family. *Structure* 9: 699–706, 2001. doi: 10.1016/S0969–2126 (01)00634–7.
  97. **Chandra V, Huang P, Hamuro Y, Raghuram S, Wang Y, Burris TP, Rastinejad F.** Structure of the intact PPAR- $\gamma$ -RXR- $\alpha$  nuclear receptor complex on DNA. *Nature* 456: 350–356, 2008. doi: 10.1038/nature07413.
  98. **Hummasti S, Tontonoz P.** The peroxisome proliferator-activated receptor N-terminal domain controls isotype-selective gene expression and adipogenesis. *Mol Endocrinol* 20: 1261–1275, 2006. doi: 10.1210/me.2006–0025.
  99. **Berger J, Moller DE.** The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53: 409–435, 2002.
  100. **Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK.** A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- $\gamma$ . *Nature* 437: 759–763, 2005. doi: 10.1038/nature03988.
  101. **Ciccodicola A, Costa V, Gallo MA, Letizia F, Aprile M, Casamassimi A.** PPARG: Gene expression regulation and next-generation sequencing for unsolved issues. *PPAR Res.* 2010 Hindawi Limited: 17, 2010.
  102. **Issemann I, Prince RA, Tugwood JD, Green S.** The peroxisome proliferator-activated receptor:retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs. *J Mol Endocrinol* 11: 37–47, 1993. doi: 10.1677/jme.0.0110037.
  103. **Ngala RA, Stocker CJ, Roy AG, Hislop D, Wargent E, Bell R, Hassall DG, Harling JD, Billin AN, Willson TM, Arch JRS, Cawthorne MA.** A new, highly selective murine peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  agonist increases responsiveness to thermogenic stimuli and glucose uptake in skeletal muscle in obese mice. *Diabetes, Obes Metab* 13: 455–464, 2011. doi: 10.1111/j.1463–1326.2011.01371.x.

104. **Zelcer N, Tontonoz P.** SUMOylation and PPAR $\gamma$ : Wrestling with inflammatory signaling. *Cell Metab.* 2 Cell Press: 273–275, 2005.
105. **Yuan Y, Zhang A, Huang S, Ding G, Chen R.** A PPAR $\gamma$  agonist inhibits aldosterone-induced mesangial cell proliferation by blocking ROS-dependent EGFR intracellular signaling. *Am J Physiol — Ren Physiol* 300, 2011. doi: 10.1152/ajprenal.00418.2010.
106. **Pawlak M, Lefebvre P, Staels B.** Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 62 Elsevier B.V.: 720–733, 2015.
107. **Usuda D.** Peroxisome proliferator-activated receptors for hypertension. *World J Cardiol* 6: 744, 2014. doi: 10.4330/wjc.v6.i8.744.
108. **Lim S, Lee KS, Lee JE, Park HS, Kim KM, Moon JH, Choi SH, Park KS, Kim YB, Jang HC.** Effect of a new PPAR-gamma agonist, lobeglitazone, on neointimal formation after balloon injury in rats and the development of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 243: 107–119, 2015. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.08.037.
109. **Gervois P, Torra IP, Fruchart JC, Staels B.** Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin. Chem. Lab. Med.* 38 Walter de Gruyter and Co.: 3–11, 2000.
110. **Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, Staels B.** Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 Lippincott Williams & Wilkins: 717–726, 2002.
111. **Wang P, Li B, Cai G, Huang M, Jiang L, Pu J, Li L, Wu Q, Zuo L, Wang Q, Zhou P.** Activation of PPAR- $\gamma$  by pioglitazone attenuates oxidative stress in aging rat cerebral arteries through upregulating UCP2. *J Cardiovasc Pharmacol* 64: 497–506, 2014. doi: 10.1097/FJC.000000000000143.
112. **Ishibashi J, Seale P.** Functions of Prdm16 in thermogenic fat cells. *Temperature* 2 Routledge: 65–72, 2015.
113. **KERSTEN S, MANDARD S, ESCHER P, GONZALEZ FJ, TAFURI S,**

- DESVERGNE B, WAHLI W.** The peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  regulates amino acid metabolism. *FASEB J* 15: 1971–1978, 2001. doi: 10.1096/fj.01–0147com.
114. **Zhao S, Kanno Y, Li W, Wakatabi H, Sasaki T, Koike K, Nemoto K, Li H.** Picrasidine N Is a Subtype-Selective PPAR $\beta/\delta$  Agonist. *J Nat Prod* 79: 879–885, 2016. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00909.
115. **Kökény G, Calvier L, Legchenko E, Chouvarine P, Mózes MM, Hansmann G.** PPAR $\gamma$  is a gatekeeper for extracellular matrix and vascular cell homeostasis: Beneficial role in pulmonary hypertension and renal/cardiac/pulmonary fibrosis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 29 Lippincott Williams and Wilkins: 171–179, 2020.
116. **Yoon T, Ahn SS, Song JJ, Park YB, Lee SW.** Soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 is inversely correlated with the activity of ANCA-Associated vasculitis. *Yonsei Med J* 61: 720–725, 2020. doi: 10.3349/ymj.2020.61.8.720.
117. **Popeijus HE, van Otterdijk SD, van der Krieken SE, Konings M, Serbonij K, Plat J, Mensink RP.** Fatty acid chain length and saturation influences PPAR $\alpha$  transcriptional activation and repression in HepG2 cells. *Mol Nutr Food Res* 58: 2342–2349, 2014. doi: 10.1002/mnfr.201400314.
118. **Zhang W, Sun Q, Zhong W, Sun X, Zhou Z.** Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Signaling Contributes to Alcohol-Induced Hepatic Steatosis and Inflammation in Mice. *Alcohol Clin Exp Res* 40: 988–999, 2016. doi: 10.1111/acer.13049.
119. **Tuo L, Xiang J, Pan X, Hu J, Tang H, Liang L, Xia J, Hu Y, Zhang W, Huang A, Wang K, Tang N.** PCK1 negatively regulates cell cycle progression and hepatoma cell proliferation via the AMPK/p27 Kip1 axis. *J Exp Clin Cancer Res* 38: 50, 2019. doi: 10.1186/s13046–019–1029-y.
120. **Ketsawatsomkron P, Lorca RA, Keen HL, Weatherford ET, Liu X, Pelham CJ, Grobe JL, Faraci FM, England SK, Sigmund CD.** PPAR $\gamma$  regulates resistance vessel tone through a mechanism involving rgs5-mediated control of protein kinase c and



- BKCa channel activity. *Circ Res* 111: 1446–1458, 2012. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.271577.
121. **Cantoni S, Galletti M, Zambelli F, Valente S, Ponti F, Tassinari R, Pasquinelli G, Galiè N, Ventura C.** Sodium butyrate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration in pulmonary artery smooth muscle cells through Akt inhibition. *FEBS J* 280: 2042–2055, 2013. doi: 10.1111/febs.12227.
  122. **Schock SC, Xu J, Duquette PM, Qin Z, Lewandowski AJ, Rai PS, Thompson CS, Seifert EL, Harper ME, Chen HH.** Rescue of n-eurons from ischemic injury by peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  requires a novel essential cofactor LMO4. *J Neurosci* 28: 12433–12444, 2008. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2897–08.2008.
  123. **Mahadev K, Wu X, Donnelly S, Ouedraogo R, Eckhart AD, Goldstein BJ.** Adiponectin inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration of human coronary artery endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2008;78(2):376-384. doi:10.1093/cvr/cvn034
  124. **Marionneau C, Aimond F, Brunet S, Niwa N, Finck B, Kelly DP, Nerbonne JM.** PPAR $\alpha$ -mediated remodeling of repolarizing voltage-gated K<sup>+</sup> (K<sub>v</sub>) channels in a mouse model of metabolic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 44: 1002–1015, 2008. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.03.023.
  125. **Staruschenko A, Pavlov TS, Imig JD.** Regulation of ENaC-mediated sodium reabsorption by peroxisome proliferator-activated receptors. *PPAR Res.*: 2010.
  126. **Argmann C, Dobrin R, Heikkinen S, Auburtin A, Pouilly L, Cock TA, Koutnikova H, Zhu J, Schadt EE, Auwerx J.** Ppar $\gamma$ 2 is a key driver of longevity in the mouse. *PLoS Genet* 5, 2009. doi: 10.1371/journal.pgen.1000752.
  127. **Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA.** PPAR $\gamma$  in human and mouse physiology. *Biochim. Biophys. Acta — Mol. Cell Biol. Lipids* 1771: 999–1013, 2007.
  128. **Jay AG, Hamilton JA.** The enigmatic membrane fatty acid transporter CD36: New insights into fatty acid binding and their effects on uptake of oxidized LDL. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 138 Churchill Livingstone: 64–70, 2018.

129. **Lu Y, Zhou Q, Shi Y, Liu J, Zhong F, Hao X, Li C, Chen N, Wang W.** SUMOylation of PPAR $\gamma$  by Rosiglitazone Prevents LPS-Induced NCoR Degradation Mediating Down Regulation of Chemokines Expression in Renal Proximal Tubular Cells. *PLoS One* 8: e79815, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0079815.
130. **Kleinert H, Art J, Pautz A.** Regulation of the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase. In: *Nitric Oxide*. Elsevier Inc., 2010, p. 211–267.
131. **Penumetcha M, Santanam N.** Nutraceuticals as ligands of PPAR $\gamma$ . *PPAR Res.*: 2012.
132. **Scirpo R, Fiorotto R, Villani A, Amenduni M, Spirli C, Strazzabosco M.** Stimulation of nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  limits NF- $\kappa$ B-dependent inflammation in mouse cystic fibrosis biliary epithelium. *Hepatology* 62: 1551–1562, 2015. doi: 10.1002/hep.28000.
133. **Kroker AJ, Bruning JB.** Review of the structural and dynamic mechanisms of PPAR  $\gamma$  partial agonism. *PPAR Res.* 2015 Hindawi Publishing Corporation: 2015.
134. **Zhang Q, Southall MD, Mezsick SM, Johnson C, Murphy RC, Konger RL, Travers JB.** Epidermal peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  as a target for ultraviolet B radiation. *J Biol Chem* 280: 73–79, 2005. doi: 10.1074/jbc.M409795200.
135. **Baker PRS, Lin Y, Schopfer FJ, Woodcock SR, Groeger AL, Batthyany C, Sweeney S, Long MH, Iles KE, Baker LMS, Branchaud BP, Chen YE, Freeman BA.** Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: Multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem* 280: 42464–42475, 2005. doi: 10.1074/jbc.M504212200.
136. **Cariou B, Charbonnel B, Staels B.** Thiazolidinediones and PPAR $\gamma$  agonists: Time for a reassessment. *Trends Endocrinol. Metab.* 23 Trends Endocrinol Metab: 205–215, 2012.
137. **Huang J V., Greyson CR, Schwartz GG.** PPAR- $\gamma$  as a therapeutic target in cardiovascular disease: Evidence and uncertainty. *J. Lipid Res.* 53 American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 1738–1754, 2012.

138. **Davies SS, Pontsler A V., Marathe GK, Harrison KA, Murphy RC, Hinshaw JC, Prestwich GD, St. Hilaire A, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM, Hilaire A St., Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM.** No Title. *J Biol Chem* 276: 16015–16023, 2001. doi: 10.1074/jbc.M100878200.
139. **Schopfer FJ, Lin Y, Baker PRS, Cui T, Garcia-Barrio M, Zhang J, Chen K, Chen YE, Freeman BA.** Nitrolinoleic acid: An endogenous peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2340–2345, 2005. doi: 10.1073/pnas.0408384102.
140. **Marmolino D, Acquaviva F, Pinelli M, Monticelli A, Castaldo I, Filla A, Coccozza S.** PPAR- $\gamma$  agonist azelaoyl PAF increases frataxin protein and mRNA expression. new implications for the Friedreich's Ataxia Therapy. *Cerebellum* 8: 98–103, 2009. doi: 10.1007/s12311-008-0087-z.
141. **Feng L, Liu W, Yang J, Wang Q, Wen S.** Effect of hexadecyl azelaoyl phosphatidylcholine on cardiomyocyte apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury: A hypothesis. *Med Sci Monit* 24: 2661–2667, 2018. doi: 10.12659/MSM.907578.
142. **Kintscher U.** And in the end-Telmisartan directly binds to PPAR $\gamma$ . *Hypertens. Res.* 35 Nature Publishing Group: 704–705, 2012.
143. **Fujimura A, Ushijima K, Ando H.** Does the PPAR- $\gamma$ -activating property of telmisartan provide a benefit in clinical practice. *Hypertens. Res.* 36 Nature Publishing Group: 183, 2013.
144. **Ayza MA, Zewdie KA, Tesfaye BA, Gebrekirstos ST, Berhe DF.** <p>Anti-Diabetic Effect of Telmisartan Through its Partial PPAR $\gamma$ -Agonistic Activity</p>. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther* Volume 13: 3627–3635, 2020. doi: 10.2147/DMSO.S265399.
145. **Kim HK, Youm JB, Lee SR, Lim SE, Lee SY, Ko TH, Long LT, Nilius B, Won DN, Noh JH, Ko KS, Rhee BD, Kim N, Han J.** The angiotensin receptor blocker and PPAR- $\gamma$  agonist, telmisartan, delays inactivation of voltage-gated sodium channel in rat

- heart: novel mechanism of drug action. *Pflugers Arch* 464: 631–643, 2012. doi: 10.1007/s00424-012-1170-3.
146. **Amin F, Memarzia A, Rad HK, Kazerani HR, Boskabady MH.** Carvacrol and PPAR $\gamma$  agonist, pioglitazone, affects inhaled paraquat-induced lung injury in rats. *Sci Rep* 11: 8129, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-87546-8.
147. **Hotta M, Nakata R, Katsukawa M, Hori K, Takahashi S, Inoue H.** Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  and suppresses COX-2 expression [Online]. *J Lipid Res* 51, 2010. /pmc/articles/PMC2789773/ [23 Apr. 2021].
148. **Tian J, Wong WT, Tian XY, Zhang P, Huang Y, Wang N.** Rosiglitazone attenuates endothelin-1-induced vasoconstriction by upregulating endothelial expression of endothelin b receptor. *Hypertension* 56: 129–135, 2010. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.150375.
149. **Maguire JJ, Davenport AP.** Endothelin Receptors and Their Antagonists. *Semin. Nephrol.* 35 W.B. Saunders: 125–136, 2015.
150. **Mazzuca MQ, Khalil RA.** Vascular endothelin receptor type B: Structure, function and dysregulation in vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* 84 Elsevier Inc.: 147–162, 2012.
151. **Sweet DR, Fan L, Hsieh PN, Jain MK.** Krüppel-Like Factors in Vascular Inflammation: Mechanistic Insights and Therapeutic Potential. *Front. Cardiovasc. Med.* 5 Frontiers Media S.A.: 1, 2018.
152. **Borges GR, Morgan DA, Ketsawatsomkron P, Mickle AD, Thompson AP, Cassell MD, Mohapatra DP, Rahmouni K, Sigmund CD.** Interference with PPAR $\gamma$  in Vascular Smooth Muscle Causes Baroreflex Impairment and Autonomic Dysfunction. *Hypertension* 64: 590, 2014. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03553.
153. **Holobotovskyy V, Chong YS, Burchell J, He B, Phillips M, Leader L, Murphy T V., Sandow SL, McKittrick DJ, Charles AK, Tare M, Arnolda LF, Ganss R.** Regulator of G protein signaling 5 is a determinant of gestational hypertension and preeclampsia. *Sci Transl Med* 7, 2015. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa5038.

154. **Chen T-S, Lai M-C, Hung T-Y, Lin K-M, Huang C-W, Wu S-N.** Pioglitazone, a PPAR- $\gamma$  Activator, Stimulates BKCa but Suppresses IKM in Hippocampal Neurons. *Front Pharmacol* 9: 977, 2018. doi: 10.3389/fphar.2018.00977.
155. **Ketsawatsomkron P, Sigmund CD.** Molecular mechanisms regulating vascular tone by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 24: 123–130, 2015. doi: 10.1097/MNH.000000000000103.
156. **Grygiel-Górniak B.** Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: Nutritional and clinical implications — A review. *Nutr J* 13: 17, 2014. doi: 10.1186/1475–2891–13–17.
157. **Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM.** PPARs: the vasculature, inflammation and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18: 128–133, 2009. doi: 10.1097/MNH.0b013e328325803b.
158. **Lehrke M, Lazar MA.** The many faces of PPAR $\gamma$ . *Cell* 123 Elsevier B.V.: 993–999, 2005.
159. **Katafuchi T, Holland WL, Kollipara RK, Kittler R, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA.** PPAR $\gamma$ -K107 SUMOylation regulates insulin sensitivity but not adiposity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: 12102–12111, 2018. doi: 10.1073/pnas.1814522115.
160. **Kim H II, Ahn YH.** Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  in the Glucose-Sensing Apparatus of Liver and  $\beta$ -Cells. In: *Diabetes*. American Diabetes Association Inc., p. S60–S65.
161. **Whitehead JP.** Diabetes: New conductors for the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) orchestra. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 1071–4, 2011. doi: 10.1016/j.biocel.2011.04.017.
162. **Moraes R dos A, Webb RC, Silva DF.** Vascular Dysfunction in Diabetes and Obesity: Focus on TRP Channels. *Front Physiol* 12: 645109, 2021. doi: 10.3389/FPHYS.2021.645109.
163. **Ma X, Du J, Zhang P, Deng J, Liu J, Lam FFY, Li RA, Huang Y, Jin J, Yao X.** Functional role of TRPV4-KCa2.3 signaling in vascular endothelial cells in normal and

- streptozotocin-induced diabetic rats. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 62: 134–139, 2013. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01500.
164. **Greenstein AS, Kadir SZAS, Csato V, Sugden SA, Baylie RA, Eisner DA, Nelson MT.** Disruption of Pressure-Induced Ca<sup>2+</sup> Spark Vasoregulation of Resistance Arteries, Rather Than Endothelial Dysfunction, Underlies Obesity-Related Hypertension. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 75: 539–548, 2020. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13540.
165. **Liu Y, Xie A, Singh AK, Ehsan A, Choudhary G, Dudley S, Sellke FW, Feng J.** Inactivation of Endothelial Small/Intermediate Conductance of Calcium-Activated Potassium Channels Contributes to Coronary Arteriolar Dysfunction in Diabetic Patients. *J Am Heart Assoc* 4, 2015. doi: 10.1161/JAHA.115.002062.
166. **Akther F, Rahatullah Razan MD, Graham J, Stanhope K, Havel P, Rahimian R.** P716 Role of EDRFs in aortic and mesenteric arterial function of the UC Davis Type 2 Diabetic Mellitus (UCD-T2DM) male rats. *Eur Heart J* 40, 2019. doi: 10.1093/EURHEARTJ/EHZ747.0321.
167. **Wigg SJ, Tare M, Tonta MA, O'Brien RC, Meredith IT, Parkington HC.** Comparison of effects of diabetes mellitus on an EDHF-dependent and an EDHF-independent artery. *Am J Physiol — Hear Circ Physiol* 281: 232–240, 2001. doi: 10.1152/AJPHEART.2001.281.1.H232/ASSET/IMAGES/LARGE/H40710883007.JPG.
168. **Ren Y, Xu X, Wang X.** Altered mRNA expression of ATP-sensitive and inward rectifier potassium channel subunits in streptozotocin-induced diabetic rat heart and aorta. *J Pharmacol Sci.* 2003;93(4):478-483. doi:10.1254/jphs.93.478
169. **Sobey CG.** Potassium Channel Function in Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 28–38, 2001. doi: 10.1161/01.ATV.21.1.28.
170. **Herre DJ, Norman JB, Anderson R, Tremblay ML, Huby AC, De Chantemèle EJB.** Deletion of Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Enhances Endothelial Cyclooxygenase 2 Expression and Protects Mice from Type 1 Diabetes-Induced

- Endothelial Dysfunction. *PLoS One* 10: e0126866, 2015. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0126866.
171. **Zhu N, Liu B, Luo W, Zhang Y, Li H, Li S, Zhou Y.** Vasoconstrictor role of cyclooxygenase-1-mediated prostacyclin synthesis in non-insulin-dependent diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307, 2014. doi: 10.1152/AJPHEART.00022.2014.
172. **Mulvany MJ, Halpern W.** Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41: 19–26, 1977. doi: 10.1161/01.RES.41.1.19.
173. **Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, Novelli M, Ribes G.** Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes* 47: 224–229, 1998. doi: 10.2337/DIAB.47.2.224.
174. **Tanay A, Steinfeld I, Kupiec M, Shamir R.** Integrative analysis of genome-wide experiments in the context of a large high-throughput data compendium. *Mol Syst Biol* 1, 2005. doi: 10.1038/MSB4100005.
175. **Reho JJ, Shetty A, Dippold RP, Mahurkar A, Fisher SA.** Unique gene program of rat small resistance mesenteric arteries as revealed by deep RNA sequencing. *Physiol Rep* 3, 2015. doi: 10.14814/PHY2.12450.
176. **Zeng W, Zhang X, Lu Y, Wen Y, Xie Q, Yang X, He S, Guo Z, Li J, Shen A, Peng J.** Neferine ameliorates hypertensive vascular remodeling modulating multiple signaling pathways in spontaneously hypertensive rats. *Biomed Pharmacother* 158: 114203, 2023. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2022.114203.
177. **Zhang Y, Park C, Bennett C, Thornton M, Kim D.** Rapid and accurate alignment of nucleotide conversion sequencing reads with HISAT-3N. *Genome Res* 31: 1290–1295, 2021. doi: 10.1101/GR.275193.120.
178. **Love MI, Huber W, Anders S.** Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 2014. doi: 10.1186/S13059–014–

0550–8.

179. **Bhide A, Schliesky S, Reich M, Weber APM, Becker A.** Analysis of the floral transcriptome of *Tarenaya hassleriana* (Cleomaceae), a member of the sister group to the Brassicaceae: Towards understanding the base of morphological diversity in Brassicales. *BMC Genomics* 15, 2014. doi: 10.1186/1471–2164–15–140.
180. **Luo W, Brouwer C.** Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics* 29: 1830–1831, 2013. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTT285.
181. **Morris GM, Ruth H, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ.** AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30: 2785–2791, 2009. doi: 10.1002/JCC.21256.
182. **Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR.** Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* 4: 1–17, 2012. doi: 10.1186/1758–2946–4–17/FIGURES/14.
183. **Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, Morris JH, Ferrin TE.** UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci* 30: 70, 2021. doi: 10.1002/PRO.3943.
184. **Graves AP, Brenk R, Shoichet BK.** Decoys for Docking. *J Med Chem* 48: 3714, 2005. doi: 10.1021/JM0491187.
185. **Bento AP, Hersey A, Félix E, Landrum G, Gaulton A, Atkinson F, Bellis LJ, De Veij M, Leach AR.** An open source chemical structure curation pipeline using RDKit. *J Cheminform* 12: 1–16, 2020. doi: 10.1186/S13321–020–00456–1/FIGURES/6.
186. **O’Boyle NM.** Towards a Universal SMILES representation — A standard method to generate canonical SMILES based on the InChI. *J Cheminform* 4: 1–14, 2012. doi: 10.1186/1758–2946–4–22/COMMENTS.
187. **Bajusz D, Rácz A, Héberger K.** Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *J Cheminform* 7: 1–13, 2015. doi: 10.1186/S13321–015–0069–3/FIGURES/7.



188. **Lian N, Chen M, Zhang S, Chen L, Huang J, Lin Q.** Decreased expression of PPAR $\gamma$  is associated with aortic endothelial cell apoptosis in intermittently hypoxic rats. *Sleep Breath* 25: 2241–2250, 2021. doi: 10.1007/S11325–021–02319–X.
189. **Hamblin M, Chang L, Zhang H, Yang K, Zhang J, Chen YE.** Vascular smooth muscle cell peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  deletion promotes abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 52: 984–993, 2010. doi: 10.1016/J.JVS.2010.05.089.
190. **Goto K, Kitazono T.** The Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Channel and Cardiovascular Disease Risk Factors. *Front Physiol* 12: 728979, 2021. doi: 10.3389/FPHYS.2021.728979/BIBTEX.
191. **Zhu Y, Chu Y, Wang S, Tang J, Li H, Feng L, Yu F, Ma X.** Vascular Smooth Muscle TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid Family Member 4) Channels Regulate Vasoconstriction and Blood Pressure in Obesity. *Hypertension* 80: 757–770, 2023. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.20109.
192. **Bittner S, Ruck T, Schuhmann MK, Herrmann AM, Maati HMO, Bobak N, Göbel K, Langhauser F, Stegner D, Ehling P, Borsotto M, Pape HC, Nieswandt B, Kleinschnitz C, Heurteaux C, Galla HJ, Budde T, Wiendl H, Meuth SG.** Endothelial TWIK-related potassium channel-1 (TREK1) regulates immune-cell trafficking into the CNS. *Nat Med* 2013 199 19: 1161–1165, 2013. doi: 10.1038/nm.3303.
193. **Andresen J, Lloyd E, Bryan R.** The K2P channel, TRAAK; expression and function in cerebral arteries. *FASEB J* 21: LB97–LB97, 2007. doi: 10.1096/FASEBJ.21.6.LB97-A.
194. **Pathan AR, Rusch NJ.** Two-pore domain K<sup>+</sup> channels: Evidence for TWIK-2 in blood pressure regulation. *Hypertension* 58: 539–541, 2011. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.179390.
195. **Xu C, Lu Y, Tang G, Wang R.** Expression of voltage-dependent K<sup>+</sup> channel genes in mesenteric artery smooth muscle cells. *Am J Physiol — Gastrointest Liver Physiol* 277: 1055–1063, 1999. doi:

10.1152/AJPGI.1999.277.5.G1055/ASSET/IMAGES/LARGE/AGIJ31113006Y.JPEG

- .
196. **Cox RH, Folander K, Swanson R.** Differential Expression of Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel Genes in Arteries From Spontaneously Hypertensive and Wistar-Kyoto Rats. *Hypertension* 37: 1315–1322, 2001. doi: 10.1161/01.HYP.37.5.1315.
  197. **Hu XQ, Zhang L.** Oxidative Regulation of Vascular Cav1.2 Channels Triggers Vascular Dysfunction in Hypertension-Related Disorders. *Antioxidants* 11, 2022. doi: 10.3390/ANTIOX11122432.
  198. **Kant S, Sellke F, Feng J.** Metabolic regulation and dysregulation of endothelial small conductance calcium activated potassium channels. *Eur J Cell Biol* 101: 151208, 2022. doi: 10.1016/J.EJCB.2022.151208.
  199. **Martinelli AM, Rodrigues CN dos S, de Moraes TF, Rodrigues GJ.** In Endothelial Cells, the Activation or Stimulation of Soluble Guanylyl Cyclase Induces the Nitric Oxide Production by a Mechanism Dependent of Nitric Oxide Synthase Activation. *J Pharm Pharm Sci* 21: 38–45, 2018. doi: 10.18433/JPPS29578.
  200. **Schermuly RT, Stasch JP, Pullamsetti SS, Middendorff R, Müller D, Schlüter KD, Dingendorf A, Hackemack S, Kolosionek E, Kaulen C, Dumitrascu R, Weissmann N, Mittendorf J, Klepetko W, Seeger W, Ghofrani HA, Grimminger F.** Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 32: 881–891, 2008. doi: 10.1183/09031936.00114407.
  201. pCLAMP 11 Software Suite | Molecular Devices [Online]. <https://www.moleculardevices.com/products/axon-patch-clamp-system/acquisition-and-analysis-software/pclamp-software-suite>.
  202. **R Core Team.** R: A Language and Environment for Statistical Computing [Online]. 2021. <https://www.r-project.org/>.
  203. **West RM.** Best practice in statistics: Use the Welch t-test when testing the difference between two groups. *Ann Clin Biochem* 58: 267–269, 2021. doi: 10.1177/0004563221992088/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\_0004563221992088

-FIG1.JPEG.

204. **Delacre M, Leys C, Mora YL, Lakens D.** Taking Parametric Assumptions Seriously: Arguments for the Use of Welch's F-test instead of the Classical F-test in One-Way ANOVA. *Int Rev Soc Psychol* 32, 2019. doi: 10.5334/IRSP.198.
205. **Abdi H, Williams LJ.** Encyclopedia of Research Design [Online]. <http://www.utd.edu/~herve>
206. **Lopes, R & Reid, Ivan & Hobson, Peter.** (2007). The two-dimensional Kolmogorov-Smirnov test. XI International Workshop on Advanced Computing and Analysis Techniques in Physics Research.
207. **Kemal Ö.** Power Analysis and Sample Size, When and Why? *Turkish Arch Otorhinolaryngol* 58: 3, 2020. doi: 10.5152/TAO.2020.0330.
208. **Patil I.** Visualizations with statistical details: The «ggstatsplot» approach. *J Open Source Softw* 6: 3167, 2021. doi: 10.21105/JOSS.03167.
209. **Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH.** K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. 396: 269–272, 1998. doi: 10.1038/24388.
210. **Edwards G, Félétou M, Gardener MJ, Thollon C, Vanhoutte PM, Weston AH.** Role of gap junctions in the responses to EDHF in rat and guinea-pig small arteries. *Br J Pharmacol* 128: 1788–1794, 1999. doi: 10.1038/SJ.BJP.0703009.
211. **Wei R, Lunn SE, Tam R, Gust SL, Classen B, Kerr PM, Plane F.** Vasoconstrictor stimulus determines the functional contribution of myoendothelial feedback to mesenteric arterial tone. *J Physiol* 596: 1181–1197, 2018. doi: 10.1113/JP274797.
212. **Phuong TTT, Redmon SN, Yarishkin O, Winter JM, Li DY, Križaj D.** Calcium influx through TRPV4 channels modulates the adherens contacts between retinal microvascular endothelial cells. *J Physiol* 595: 6869–6885, 2017. doi: 10.1113/JP275052.
213. **Félétou M.** Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br J Pharmacol* 156: 545, 2009. doi: 10.1111/J.1476–

5381.2009.00052.X.

214. **Light PE, French RJ.** Glibenclamide selectively blocks ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels reconstituted from skeletal muscle. *Eur J Pharmacol* 259: 219–222, 1994. doi: 10.1016/0014-2999(94)90647-5.
215. **Ryan MJ, Didion SP, Mathur S, Faraci FM, Sigmund CD.** PPAR $\gamma$  Agonist Rosiglitazone Improves Vascular Function and Lowers Blood Pressure in Hypertensive Transgenic Mice. *Hypertension* 43: 661–666, 2004. doi: 10.1161/01.HYP.0000116303.71408.C2.
216. **Lee HM, Yoon SH, Kim MG, Hahn SJ, Choi BH.** Effects of rosiglitazone, an antidiabetic drug, on Kv3.1 channels. *Korean J Physiol Pharmacol* 27: 95–103, 2023. doi: 10.4196/KJPP.2023.27.1.95.
217. **Jeong I, Choi BH, Hahn SJ.** Rosiglitazone inhibits Kv4.3 potassium channels by open-channel block and acceleration of closed-state inactivation. *Br J Pharmacol* 163: 510, 2011. doi: 10.1111/J.1476-5381.2011.01210.X.
218. **Lee HM, Hahn SJ, Choi BH.** The antidiabetic drug rosiglitazone blocks Kv1.5 potassium channels in an open state. *Korean J Physiol Pharmacol* 26: 135, 2022. doi: 10.4196/KJPP.2022.26.2.135.
219. **Kang Y, Liu R, Wu JX, Chen L.** Structural insights into the mechanism of human soluble guanylate cyclase. *Nat* 2019 5747777 574: 206–210, 2019. doi: 10.1038/s41586-019-1584-6.
220. **Kaikini A, Dhodi Di, Muke S, Peshattiwar V, Bagle S, Korde A, Sarnaik J, Kadwad V, Sachdev S, Sathaye S.** Standardization of type 1 and type 2 diabetic nephropathy models in rats: Assessment and characterization of metabolic features and renal injury. *J Pharm Bioallied Sci* 12: 295, 2020. doi: 10.4103/JPBS.JPBS\_239\_19.
221. **Hermann A, F. G, M. T.** BK Channels — Focus on Polyamines, Ethanol/Acetaldehyde and Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S). In: *Patch Clamp Technique*. InTech, 2012.
222. **Wang D, Borrego-Conde LJ, Falck JR, Sharma KK, Wilcox CS, Umans JG.** Contributions of nitric oxide, EDHF, and EETs to endothelium-dependent relaxation in

- renal afferent arterioles. *Kidney Int* 63: 2187–2193, 2003. doi: 10.1046/J.1523–1755.2003.00036.X.
223. **Quyyumi AA, Ozkor MA.** Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor and Vascular Function. *Cardiol Res Pract* 2011, 2011. doi: 10.4061/2011/156146.
224. **Woodman OL, Wongsawatkul O, Sobey CG.** Contribution of nitric oxide, cyclic GMP and K<sup>+</sup> channels to acetylcholine-induced dilatation of rat conduit and resistance arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27: 34–40, 2000. doi: 10.1046/J.1440–1681.2000.03199.X.
225. **Sonkusare SK, Dalsgaard T, Bonev AD, Nelson MT.** Inward rectifier potassium (Kir2.1) channels as end-stage boosters of endothelium-dependent vasodilators. *J Physiol* 594: 3271–3285, 2016. doi: 10.1113/JP271652.
226. **Wu Y, Liu Y, Hou P, Yan Z, Kong W, Liu B, Li X, Yao J, Zhang Y, Qin F, Ding J.** TRPV1 Channels Are Functionally Coupled with BK (mSlo1) Channels in Rat Dorsal Root Ganglion (DRG) Neurons. *PLoS One* 8: e78203, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0078203.
227. **Werner M, Ledoux J.** K<sup>+</sup> channels in biological processes: vascular K<sup>+</sup> channels in the regulation of blood pressure. *J Receptor Ligand Channel Res* 7: 51, 2014. doi: 10.2147/JRLCR.S36062.
228. **Lin MT, Jian MY, Taylor MS, Cioffi DL, Yap FC, Liedtke W, Townsley MI.** Functional coupling of TRPV4, IK, and SK channels contributes to Ca<sup>2+</sup>-dependent endothelial injury in rodent lung. *Pulm Circ* 5: 279–290, 2015. doi: 10.1086/680166.
229. **Cui M, Qin G, Yu K, Bowers MS, Zhang M.** Targeting the Small- and Intermediate-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated Potassium Channels: The Drug-Binding Pocket at the Channel/Calmodulin Interface. *Neurosignals* 22: 65–78, 2015. doi: 10.1159/000367896.
230. **De Angelis A, Rinaldi B, Capuano A, Rossi F, Filippelli A.** Indomethacin potentiates acetylcholine-induced vasodilation by increasing free radical production. *Br J Pharmacol* 142: 1233, 2004. doi: 10.1038/SJ.BJP.0705877.

231. **Wu, J., Lei, M. X., Xie, X. Y., & Feng, X. L.** (2007). Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Central South University. Medical sciences, 32(5), 824–830.
232. **Saha PS, Kim Sawtelle KR, Bamberg BN, Arrick DM, Watt MJ, Scholl JL, Zheng H, Mayhan WG.** Rosiglitazone restores nitric oxide synthase-dependent reactivity of cerebral arterioles in rats exposed to prenatal alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 45: 1359–1369, 2021. doi: 10.1111/ACER.14634.
233. **Pankevich E V., Astakhova AA, Chistyakov D V., Sergeeva MG.** Antiinflammatory Effect of Rosiglitazone via Modulation of mRNA Stability of Interleukin 10 and Cyclooxygenase 2 in Astrocytes. *Biochemistry (Mosc)* 82: 1276–1284, 2017. doi: 10.1134/S0006297917110050.
234. **Sánchez-Hidalgo M, Martín AR, Villegas I, Alarcón de la Lastra C.** Rosiglitazone, a PPAR $\gamma$  ligand, modulates signal transduction pathways during the development of acute TNBS-induced colitis in rats. *Eur J Pharmacol* 562: 247–258, 2007. doi: 10.1016/J.EJPBAR.2007.01.047.
235. **Goto K, Kitazono T.** Endothelium-Dependent Hyperpolarization (EDH) in Diabetes: Mechanistic Insights and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci* 20, 2019. doi: 10.3390/IJMS20153737.
236. **Langenstroer P, Pieper GM.** Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals. *Am J Physiol* 263, 1992. doi: 10.1152/AJPHEART.1992.263.1.H257.
237. **Gao X, Martinez-Lemus LA, Zhang C.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor and diabetes. *World J Cardiol* 3: 25, 2011. doi: 10.4330/WJC.V3.I1.25.
238. **Absi M, Oso H, Khattab M.** The effect of streptozotocin-induced diabetes on the EDHF-type relaxation and cardiac function in rats. *J Adv Res* 4: 375–383, 2013. doi: 10.1016/J.JARE.2012.07.005.
239. **Hu W, Huang J, Luo L, Chen R, Liu H, Xu J, Chen W, Ding Y, Yu H.** Study on the role of calcium channel protein TRPV4 in the inflammatory pathway of type 2 diabetic adipose tissue based on gene databases. *Biochem Biophys Res Commun* 639: 161–168,

2023. doi: 10.1016/J.BBRC.2022.11.078.

240. **Hills CE, Bland R, Squires PE.** Functional expression of TRPV4 channels in human collecting duct cells: implications for secondary hypertension in diabetic nephropathy. *Exp Diabetes Res* 2012, 2012. doi: 10.1155/2012/936518.
241. **Arredondo Zamarripa D, Noguez Imm R, Bautista Cortés AM, Vázquez Ruíz O, Bernardini M, Fiorio Pla A, Gkika D, Prevarskaya N, López-Casillas F, Liedtke W, Clapp C, Thébault S.** Dual contribution of TRPV4 antagonism in the regulatory effect of vasoinhibins on blood-retinal barrier permeability: diabetic milieu makes a difference. *Sci Reports* 2017 7: 1–16, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-13621-8.
242. **Kaneko Y, Szallasi A.** Transient receptor potential (TRP) channels: A clinical perspective. *Br. J. Pharmacol.* 171 John Wiley and Sons Inc.: 2474–2507, 2014.
243. **Yi F, Ling TY, Lu T, Wang XL, Li J, Claycomb WC, Shen WK, Lee HC.** Down-regulation of the Small Conductance Calcium-activated Potassium Channels in Diabetic Mouse Atria. *J Biol Chem* 290: 7016–7026, 2015. doi: 10.1074/JBC.M114.607952.
244. **Szeto V, Chen NH, Feng ZP, Sun HS.** The role of KATP channels in cerebral ischemic stroke and diabetes. *Acta Pharmacol Sin* 2018 39: 683–694, 2018. doi: 10.1038/aps.2018.10.
245. **Chen ZC, Cheng YZ, Chen LJ, Cheng KC, Li YX, Cheng JT.** Increase of ATP-sensitive potassium (K ATP) channels in the heart of type-1 diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 11: 1–9, 2012. doi: 10.1186/1475-2840-11-8/FIGURES/5.
246. **Nangle MR, Cotter MA, Cameron NE.** Effects of Rosuvastatin on Nitric Oxide-Dependent Function in Aorta and Corpus Cavernosum of Diabetic Mice Relationship to Cholesterol Biosynthesis Pathway Inhibition and Lipid Lowering. *Diabetes* 52: 2396–2402, 2003. doi: 10.2337/DIABETES.52.9.2396.
247. **Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP.** Impaired Nitric Oxide Synthase Pathway in Diabetes Mellitus. *Circulation* 106: 987–992, 2002. doi: 10.1161/01.CIR.0000027109.14149.67.
248. **Boyle JG, Logan PJ, Ewart MA, Reihill JA, Ritchie SA, Connell JMC, Cleland SJ,**

- Salt IP.** Rosiglitazone Stimulates Nitric Oxide Synthesis in Human Aortic Endothelial Cells via AMP-activated Protein Kinase,. *J Biol Chem* 283: 11210–11217, 2008. doi: 10.1074/JBC.M710048200.
249. **Akdag H, Murat N, Evcim S, Esen A, Gidener S.** Acute effect of rosiglitazone on relaxation responses in hypercholesterolemic corpus cavernosum. *Int J Impot Res* 28: 110–113, 2016. doi: 10.1038/IJIR.2016.11.
250. **Ahn SJ, Fancher IS, Bian JT, Zhang CX, Schwab S, Gaffin R, Phillips SA, Levitan I.** Inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels are major contributors to flow-induced vasodilatation in resistance arteries. *J Physiol* 595: 2339, 2017. doi: 10.1113/JP273255.
251. **Honda H, Ushijima D, Ishihara H, Yanase M, Kogo H.** A Regional Variation of Acetylcholine-Induced Relaxation in Different Segments of Rat Aorta. *Physiol Behav* 63: 55–58, 1997. doi: 10.1016/S0031–9384 (97)00388–0.
252. **Giepmans BNG, Verlaan I, Hengeveld T, Janssen H, Calafat J, Falk MM, Moolenaar WH.** Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr Biol* 11: 1364–1368, 2001. doi: 10.1016/S0960–9822 (01)00424–9.
253. **Makino A, Firth AL, Yuan JXJ.** No Title [Online]. *Compr Physiol* 1, 2011. /pmc/articles/PMC5524522/ [11 May 2020].
254. **Fan G, Cui Y, Gollasch M, Kassmann M.** Elementary calcium signaling in arterial smooth muscle. *Channels* 13: 505, 2019. doi: 10.1080/19336950.2019.1688910.
255. **Braunstein TH, Inoue R, Cribbs L, Oike M, Ito Y, Holstein-Rathlou NH, Jensen LJ.** The role of L- and T-type calcium channels in local and remote calcium responses in rat mesenteric terminal arterioles. *J Vasc Res* 46: 138–151, 2009. doi: 10.1159/000151767.
256. **Moosmang S, Schulla V, Welling A, Feil R, Feil S, Wegener JW, Hofmann F, Klugbauer N.** Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *EMBO J* 22: 6027–6034, 2003. doi: 10.1093/EMBOJ/CDG583.