

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*



**Селиванова Екатерина Константиновна**

**МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ  
НА АРТЕРИИ КРЫС**

Специальность 03.03.01 – Физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Научный руководитель:**

*Тарасова Ольга Сергеевна – доктор биологических наук, доцент*

**Официальные оппоненты:**

*Шпаков Александр Олегович – доктор биологических наук, ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, лаборатория молекулярной эндокринологии и нейрхимии, заведующий лабораторией, заместитель директора по науке*

*Кожевникова Любовь Михайловна – доктор медицинских наук, ФГБНУ НИИ Общей патологии и патофизиологии, лаборатория хронического воспаления и микроциркуляции, главный научный сотрудник*

*Ханчаев Аскер Юсуфович – кандидат биологических наук, Институт экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, лаборатория клеточной подвижности, старший научный сотрудник*

Защита диссертации состоится «22» ноября 2021 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.03.06 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

Email: [bellaum@mail.ru](mailto:bellaum@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/389590017/>

Автореферат разослан «22» октября 2021 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета МГУ.03.06,  
доктор биологических наук



Б.А. Умарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Тиреоидные гормоны, трийодотиронин ( $T_3$ ) и тироксин ( $T_4$ ), – важные регуляторы работы сердечно-сосудистой системы. Изменение тиреоидного статуса организма человека часто сопровождается нарушением функционирования сердца и кровеносных сосудов (Danzi, Klein, 2014) и может служить фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (Jabbar et al., 2016), которые остаются одной из ведущих причин смертности населения в России и других странах (Искаков, 2017; Шальнова и др., 2012). В связи с этим изучение механизмов влияния тиреоидных гормонов на сердечно-сосудистую систему имеет высокую практическую значимость. Нужно отметить, что на данный момент малоизученным остается действие тиреоидных гормонов на сосуды, в частности на артерии резистивного типа, тонус которых определяет уровень системного артериального давления (Magder, 2018). Тиреоидные гормоны могут вызывать снижение тонуса сосудов, действуя по двум механизмам: геномному и негеномному.

При классическом геномном действии тиреоидные гормоны связываются с ядерными рецепторами, которые выступают в роли лиганд-зависимых транскрипционных факторов, изменяющих экспрессию генов-мишеней (Bernal, 2017; Raquette et al., 2011; Vella, Hollenberg, 2017). Геномные эффекты тиреоидных гормонов проявляются через час и более после взаимодействия гормона с рецептором и имеют долговременный характер (Cheng et al., 2010; Flamant, Samarut, 2003; Mullur et al., 2014). В связи с тем, что ядерные рецепторы обладают более высоким сродством к  $T_3$ , чем к  $T_4$  (Schroeder, et al., 2014),  $T_3$  считается ключевой формой тиреоидных гормонов при их геномном действии (Bianco et al., 2019, Galton, 2017). Благодаря более высокому содержанию в крови,  $T_4$  также может оказывать геномное влияние, но вместе с тем выступает в роли прогормона, способного превращаться в более активный  $T_3$  в соответствии с нуждами тканей под действием ферментов-дейодиназ 1 и 2 типов (D1 и D2), катализирующих 5'-дейодирование (Gereben et al., 2008).

Основная дейодиназа, которая осуществляет 5'-дейодирование  $T_3$  в артериях – это дейодиназа 2 типа (D2) (Mizuma et al., 2001), она экспрессируется как в эндотелиальных, так и в гладкомышечных клетках (Aoki et al., 2015; Toyoda et al., 2009). D2 обеспечивает локальный синтез  $T_3$  (Bianco, Kim, 2006), поэтому интенсивность геномного действия тиреоидных гормонов на сосуды может зависеть от уровня экспрессии и активности в них D2. Физиологически значимую роль D2 в сосудах подтверждает связь между инактивирующим полиморфизмом гена этого фермента и более высоким риском развития артериальной гипертензии у людей с эутиреоидным статусом (Gumieniak et al., 2007). Известно, что уровень мРНК D2 в тканях может зависеть от содержания тиреоидных гормонов в крови (Burmeister et al., 1997), а также интенсивности симпатических влияний и других физиологически значимых стимулов (Bianco, Kim, 2006; Jones et al., 1986).

Тем не менее, механизмы регуляции экспрессии D2 в стенке сосудов, а также влияние продуцируемого ею внутриклеточного T<sub>3</sub> на вазомоторные реакции резистивных артерий практически не исследованы.

К негеномному механизму действия тиреоидных гормонов относят все эффекты, которые инициируют рецепторы, локализованные вне ядра (Селиванова, Тарасова, 2020; Axelband et al., 2010). Негеномное действие тиреоидных гормонов не обязательно связано с транскрипцией (Cao et al., 2005), поэтому оно проявляется сравнительно быстро, в течение нескольких минут (Hiroi et al., 2006). Негеномное действие может быть инициировано как T<sub>3</sub>, так и T<sub>4</sub> за счет большого разнообразия опосредующих его рецепторов (Bergh et al., 2005; Kalyanaraman et al., 2014; Moeller et al., 2006). Тиреоидные гормоны способны вызывать быстрое снижение тонуса артерий (Park et al., 1997; Yoneda et al., 1998), но механизмы такого влияния исследованы мало. Следует отметить, что негеномное влияние гормонов, наряду с геномным, может вносить вклад в снижение периферического сопротивления сосудов при гипертиреозе (Vargas et al., 2006).

**Степень разработанности темы.** Показано, что T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> участвуют в регуляции экспрессии D2 в некоторых тканях, например, в буром жире и коре больших полушарий (Burmeister et al., 1997; Martinez-DeMena et al., 2002). Тем не менее, влияние тиреоидных гормонов на экспрессию D2 в артериях практически не исследовано, а результаты существующих исследований довольно противоречивы. В исследованиях *in vitro* на культуре эндотелиальных клеток НМЕС-1 содержание мРНК D2 уменьшалось при добавлении T<sub>4</sub>, но не T<sub>3</sub> (Sabatino et al., 2015). Тем не менее, в экспериментах на культуре гладкомышечных клеток коронарных артерий и аорты человека T<sub>3</sub> приводил к снижению мРНК D2 в большей степени, чем T<sub>4</sub> (Mizuma et al., 2001). Пока не изучены изменения экспрессии D2 в артериях в условиях избытка тиреоидных гормонов *in vivo*.

Еще одним фактором регуляции экспрессии D2 являются адренергические влияния (Jones, Henschen, et al., 1986). Показано, что введение агонистов адренорецепторов приводит к увеличению уровня мРНК D2 в аорте крыс (Yasuzawa-Amano, Toyoda, 2004), однако неизвестно, как изменяется экспрессия данного фермента в артериях резистивного типа в условиях хронического отсутствия симпатических влияний.

Влияние других факторов, играющих значимую роль в регуляции тонуса сосудов, например оксида азота, на уровень мРНК D2 в резистивных артериях также пока не изучено. При этом известно, что экспрессия D2 различается в резистивных артериях разных органов (Sofronova et al., 2017), причем регионарная специфичность экспрессии характерна и для эндотелиальной NO-синтазы eNOS (Sofronova et al., 2017). Исходя из этого, можно предположить, что оксид азота является одним из регуляторов экспрессии D2 в артериях.

Для многих тканей, в том числе бурого жира и скелетных мышц, показана высокая функциональная значимость продукции T<sub>3</sub> под действием

D2 (Bianco, Silva, 1987b; Vocco et al., 2016), однако роль D2 в регуляции тонуса сосудов практически не изучена. Одним из подходов к решению этой проблемы может быть использование ингибиторов D2, например, иопаноевой кислоты (Coppola et al., 2005). Однако поскольку D2 является ключевым ферментом, обеспечивающим синтез внутриклеточного T<sub>3</sub> для запуска петли отрицательной обратной связи в гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системе (Christoffolete et al., 2006), системное ингибирование D2 может привести к глубокому изменению тиреоидного статуса организма и соответствующим изменениям вазорегуляции. Локальное подавление активности D2 в сосудистой стенке возможно при использовании иопаноевой кислоты в экспериментах с культивированием целых сосудов (Bolz et al., 2000; Morita et al., 2010).

Быстрая вазодилатация при негеномном действии тиреоидных гормонов показана для многих типов артерий, включая аорту, артерии тонкого кишечника, коронарные и бедренные артерии, а также артериолы скелетных мышц (Barreto-Chaves et al., 2011; Cai et al., 2015; Lozano-Cuenca et al., 2016; Park et al., 1997; Yoneda et al., 1998; Zwaveling et al., 1997). При этом данные литературы достаточно противоречивы: в одних работах утверждается, что T<sub>3</sub> вызывает более выраженную вазодилатацию (Park et al., 1997), в других – что эффекты T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> сопоставимы по величине (Yoneda et al., 1998). Работы по изучению механизмов быстрой вазодилатации также немногочисленны и противоречивы. Расслабление, вызванное тиреоидными гормонами, может быть опосредовано эндотелием (Lozano-Cuenca et al., 2016) или же не связано с эндотелиальными влияниями (Carrillo-Sepulveda, 2010). Более того, до сих пор неизвестно, какие рецепторы опосредуют быстрое влияние тиреоидных гормонов на тонус сосудов. Показано, что в культуре эндотелиальных клеток T<sub>3</sub> может взаимодействовать с TR $\alpha$ 1 (Aoki et al., 2015; Hiroi et al., 2006), что приводит к повышению активности eNOS (Hiroi et al., 2006), но неизвестно, насколько этот механизм универсален и воспроизведется ли он при воздействии T<sub>3</sub> на целый сосуд. Необходимо комплексное исследование механизмов быстрой вазодилатации при негеномном действии тиреоидных гормонов с определением функциональной активности T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub>, идентификацией рецепторов и молекулярных участников, опосредующих их влияние на резистивные артерии крыс.

Таким образом, **целью данной работы** было изучение регуляции экспрессии и функциональной роли дейодиназы 2 типа, а также механизмов негеномного влияния тиреоидных гормонов в резистивных артериях крыс.

Были поставлены следующие задачи:

- 1) исследовать влияние гипертиреоза, хронической неонатальной десимпатизации и подавления синтеза оксида азота на экспрессию дейодиназы 2 типа в резистивных артериях *in vivo*;
- 2) исследовать влияние ингибитора 5'-дейодирования на реакции сокращения и расслабления культивируемых артерий скелетных мышц;

- 3) сравнить выраженность расслабления артерий скелетных мышц при быстром негеномном действии  $T_3$  и  $T_4$ ;
- 4) идентифицировать ключевые сигнальные пути, запускаемые тиреоидными гормонами при негеномном действии в эндотелиальных и/или гладкомышечных клетках артерий скелетных мышц крысы.

**Научная новизна работы.** Впервые изучены механизмы регуляции экспрессии D2 в резистивных артериях крыс, при этом установлено, что гипертиреоз и хроническая неонатальная десимпатизация вызывают снижение уровня мРНК D2 в артериях скелетных мышц крысы. Впервые показано, что хроническое подавление синтеза оксида азота не влияет на содержание мРНК D2 в резистивных артериях. С использованием методики культивирования целых сосудов впервые установлено, что продукция  $T_3$  под влиянием D2 играет важную функциональную роль в поддержании вазомоторного действия NO. Наконец, в данной работе впервые проведено комплексное исследование механизмов негеномного влияния тиреоидных гормонов на тонус артерий скелетных мышц. Показано, что эффекты  $T_3$  и  $T_4$  опосредованы разными механизмами: эффект  $T_3$  менее выражен, чем эффект  $T_4$ , и является эндотелий-зависимым, тогда как эффект  $T_4$  реализуется на уровне гладкой мышцы. Впервые идентифицированы ключевые участники инициируемого  $T_4$  сигнального каскада: интегрин  $\alpha\upsilon\beta_3$ , протеинкиназы ERK1/2 и ILK.

**Теоретическая и практическая значимость.** С теоретической и фундаментальной точки зрения, полученные в работе результаты о механизмах регуляции экспрессии D2, а также вазомоторной роли продуцируемого ею  $T_3$  в артериях резистивного типа развивают современные представления о геномном действии тиреоидных гормонов на сосуды. Полученные данные обеспечивают понимание механизмов негеномного регуляторного влияния  $T_3$  и  $T_4$  на резистивные артерии. Знание принципов тиреоидной регуляции работы сосудов способствует пониманию процессов патогенеза сопровождающих тиреоидные нарушения заболеваний сердечно-сосудистой системы. В дальнейшем установленные закономерности могут учитываться при разработке фармакологических подходов для коррекции сосудистых нарушений, сопровождающих тиреоидные патологии, частота встречаемости которых в России неуклонно растет (Трошина и др., 2021).

**Методология и методы исследования.** При работе с животными соблюдались требования, сформулированные в Директиве Совета Европейского сообщества 2010/63/EU. Условия содержания животных и экспериментальные процедуры были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ. Для исследования механизмов регуляции экспрессии D2 были использованы следующие экспериментальные модели: курсовое введение  $T_3$  взрослым крысам, неонатальная десимпатизация путем введения гуанетидина, хроническое подавление продукции оксида азота в организме взрослых крыс с использованием ингибитора L-NAME (метилвый эфир  $N^{\omega}$ -нитро-L-аргинина). Для характеристики экспериментальных моделей оценивали

содержание тиреоидных гормонов и метаболитов NO в сыворотке крови при помощи иммуноферментного анализа и метода Грисса, соответственно, определяли уровень систолического артериального давления плетизмографическим методом, проводили морфологический анализ плотности иннервации артерий методом флуоресцентной микроскопии.

Для оценки содержания мРНК и белка D2 использовали методы полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) и Вестерн блот, соответственно. Для изучения функциональной роли D2 в сосудах использовали подход культивирования сегментов артерий (organ culture) в присутствии ингибитора D2 с последующей регистрацией их сократительных ответов в изометрическом режиме при помощи системы wire myograph.

Для исследования механизмов быстрой вазодилатации под действием  $T_3$  и  $T_4$  также использовали систему wire myograph. Роль эндотелия в негеномных эффектах тиреоидных гормонов определяли путем сравнения реакций артерий с интактным и механически удаленным эндотелием, идентификацию молекулярных участников проводили при помощи селективных ингибиторов. Для определения содержания фосфорилированных белков в артериях использовали метод Вестерн блот.

Эксперименты были проведены на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Экспрессия гена дейодиназы 2 типа в резистивных артериях скелетных мышц крысы регулируется тиреоидными и симпатическими влияниями, но не зависит от влияния оксида азота.

2. Активность дейодиназы 2 типа необходима для поддержания продукции оксида азота в артериях скелетных мышц крысы.

3.  $T_4$  вызывает более выраженное негеномное расслабление артерий скелетных мышц крысы, чем  $T_3$ , действуя через интегрин  $\alpha_v\beta_3$ , киназы ERK1/2 и ILK, локализованные в гладкомышечных клетках.

**Степень достоверности данных.** Постановка цели и задач работы, подготовка обзора литературы и обсуждения базируются на анализе актуальной литературы по теме исследования. Представленные в работе данные получены с использованием современного научного оборудования и общепринятых методов исследования. Результаты воспроизводимы и статистически достоверны.

**Апробация материалов диссертации.** Основные результаты диссертации были представлены на международной конференции Europhysiology (Лондон, Великобритания, 2018), всероссийской конференции Ломоносовские чтения (Москва, Россия, 2019, 2021), X и XI международных конференциях «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, Россия, 2019, 2021), ежегодном съезде Скандинавского физиологического общества (Рейкьявик, Исландия, 2019), III молодежной школе-конференции «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций» (Звенигород, Россия, 2019), международной конференции Enable/Radboud

New Frontiers Symposium (Неймеген, Нидерланды, 2019), VII Всероссийской с международным участием Школе-конференции по физиологии и патологии кровообращения (Москва, Россия, 2020), международной конференции Experimental Biology (дистанционно, Роквилл, США, 2021). Диссертация апробирована на заседании кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 20.09.2021 г.

**Публикации.** По теме диссертации опубликованы 5 статей и 2 тезисов докладов на конференциях в журналах, индексируемых аналитическими базами Scopus, Web of Science или RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06 по специальности физиология 03.03.01, 3 работы в сборниках статей, а также 3 тезисов докладов в сборниках материалов научных конференций.

**Личный вклад автора.** Личный вклад Е.К. Селивановой является весомым на всех этапах исследования и заключается в планировании направлений исследования, изучении и анализе современной литературы по теме работы, проведении экспериментов с использованием всех описанных выше методических подходов, обобщении и обсуждении результатов, написании статей и тезисов докладов, а также в представлении полученных данных на российских и международных конференциях и школах.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 154 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения полученных данных, заключения и выводов. Список литературы включает 312 источников. Работа иллюстрирована 8 таблицами и 38 рисунками.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В экспериментах использовали 210 половозрелых самцов крыс Вистар, полученных из вивария ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии и вивария ГНЦ РФ ИМБП РАН (Москва).

**Объект исследования.** Основным объектом исследования служила суральная артерия (*a. suralis*), обеспечивающая кровоснабжение икроножной мышцы. Известно, что изменения тиреоидного статуса сопровождаются выраженными изменениями регуляции кровотока в скелетных мышцах как у людей, так и у крыс (Bausch, McAllister, 2003; Frey, 1967; Martin et al., 1992).

**Экспериментальные модели,** использованные для изучения механизмов регуляции экспрессии D2 в артериях крыс *in vivo*.

**Гипертиреоз** вызывали путем подкожного введения раствора T<sub>3</sub> (300 мкг/кг, 1 мл/кг, Sigma-Aldrich) каждый 2 день на протяжении 5 недель. Крысам контрольной группы делали инъекции растворителя. Введение T<sub>3</sub> приводило к увеличению содержания общего и свободного T<sub>3</sub> в сыворотке крови, содержание обеих форм T<sub>4</sub> компенсаторно снижалось (таблица 1).



Таблица 1. Содержание тиреоидных гормонов в сыворотке крови крыс в использованных экспериментальных моделях.

Модель	Гипертиреоз		Десимпатизация		Подавление синтеза NO	
	Контроль (n=13)	Гипер (n=12)	Контроль (n=10)	Десимп (n=10)	Контроль (n=7)	L-NAME (n=7)
<b>Общий Т<sub>3</sub>, нМ</b>	5.5±0.6	12.2±1.3*	5.4±0.3	4.6±0.1*	3.0±0.1	3.5±0.2
<b>Свободный Т<sub>3</sub>, пМ</b>	13.4±2.0	33.6±4.7*	11.4±0.6	9.8±0.9	8.7±0.9	8.2±1.1
<b>Общий Т<sub>4</sub>, нМ</b>	106.3±4.6	19.5±1.4*	87.7±4.0	75.1±8.1	96.0±3.9	89.5±7.4
<b>Свободный Т<sub>4</sub>, пМ</b>	41.2±1.3	11.6±0.8*	35.9±2.0	33.1±2.4	25.6±1.3	25.8±2.0

Измерения проводили методом иммуноферментного анализа с использованием наборов ЗАО «НВО Иммунотех» (Москва). \* -  $p < 0.05$  по сравнению с соответствующим контролем (непарный критерий Стьюдента).

**Неонатальную десимпатизацию** проводили путем подкожного введения раствора гуанетидина сульфата (Santa Cruz Biotechnology) со 2 по 54-56 день жизни (Kostyunina et al., 2020). Доза гуанетидина со 2 по 14 день составляла 25 мг/кг, а с 15 по 54-56 день жизни – 50 мг/кг (1-2.5 мкл/г), инъекции прекращали за 2 дня до окончания эксперимента. Крысам контрольной группы вводили эквивалентный объем растворителя (0.9% NaCl). Эффективность десимпатизации была подтверждена путем визуализации адренергических нервных волокон в стенке артерий при помощи глиоксиловой кислоты (Kostyunina et al., 2020).

**Хроническое подавление синтеза NO** вызывали путем добавления в питьевую воду ингибитора NO-синтаз L-NAME (500 мг/мл, Chem Imprex) в течение 11 дней. Это воздействие приводило к повышению систолического артериального давления (измерение методом tail-cuff), а также к снижению содержания метаболитов NO в сыворотке крови в 2.5 раза по сравнению с контролем (измерение методом Грисса (Giustarini et al., 2008)).

Неонатальная десимпатизация и подавление синтеза NO не вызывали выраженных изменений тиреоидного статуса животных (таблица 1).

В конце эксперимента крыс декапитировали, собирали кровь и выделяли суральные артерии. В экспериментах с десимпатизацией и подавлением синтеза NO также выделяли артерии брыжейки (*a. mesenterica*), которые отличаются от суральной артерии по уровням экспрессии D2 и eNOS (Sofronova et al., 2016, 2017). Артерии помещали в стабилизирующий РНК буфер RNA-later (Qiagen) и хранили при -20°C до анализа экспрессии генов методом ПЦР-РВ или замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до анализа содержания белка методом Вестерн блот.

**Культивирование артерий.** Для изучения роли D2 в вазомоторных реакциях артерий суральные артерии культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе MCO-170AIC-PE (Panasonic-Sanyo) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> на протяжении 12

часов в бессывороточной среде DMEM/F12 (1:1) с добавлением 250 ед./мл стрептомицина и пенициллина (все реактивы – ПанЭко). Артерии случайным образом распределяли на 4 группы, которые культивировали в присутствии растворителя диметилсульфоксида (ДМСО, контроль, 0.15%), ингибитора 5'-дейодирования иопановой кислоты (IOP, 100 мкМ, Sigma-Aldrich), субстрата D2 T<sub>4</sub> (50 пМ, Sigma-Aldrich) и комбинации T<sub>4</sub> и IOP (50 пМ и 100 мкМ, соответственно). После культивирования артерии использовали в экспериментах по регистрации сократительной активности или замораживали в RNA-later (Qiagen) до проведения ПЦР-РВ.

**Регистрация сократительных ответов артерий.** Регистрацию сократительных ответов изолированных суральных артерий проводили в изометрическом режиме с использованием систем wire myograph (410A, 420A, 620M, DMT). В части экспериментов механически удаляли эндотелий при помощи крысиного уса. Раствор в камере миографа имел следующий состав, мМ: NaCl 120, NaHCO<sub>3</sub> 26, KCl 4.5, CaCl<sub>2</sub> 1.6, MgSO<sub>4</sub> 1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, D-глюкоза 5.5, ЭДТА 0.025, HEPES 5 (аэрация 5% карбогеном, pH 7.4, 37°C). В начале эксперимента определяли оптимальное растяжение препарата (Mulvany, Halpern, 1977), затем активировали при помощи норадреналина (10 мкМ) и агониста  $\alpha_1$ -адренорецепторов метоксамина (MX, 10 мкМ). Функциональное состояние эндотелия оценивали по реакции на ацетилхолин (АХ, 1 мкМ) на фоне вызванного MX (обычно 1-3 мкМ) субмаксимального сокращения. В артериях с интактным эндотелием АХ вызывал расслабление на 60% и более, после удаления эндотелия расслабление не превышало 20%.

**Протокол для исследования культивированных артерий.** Использовали протокол с двумя зависимостями «концентрация-эффект» («К-Э») на АХ (реакции расслабления) и двумя зависимостями «К-Э» на MX (реакции сокращения). После активации препаратов вызывали их сокращение (MX, 10 мкМ) и на его фоне кумулятивно добавляли АХ (0.01 - 1 мкМ) (первая зависимость «К-Э» на АХ). После отмывки проводили первую зависимость «К-Э» на MX (0.01 – 100 мкМ). Далее препараты отмывали, инкубировали с ингибитором NO-синтаз L-NNA (N-нитро-L-аргинин, 100 мкМ, 20 мин) и проводили вторую зависимость «К-Э» на АХ. Затем опять отмывали, повторно инкубировали с L-NNA и проводили вторую зависимость «К-Э» на MX. Для оценки чувствительности гладкой мышцы артерий к NO после отмывки проводили последнюю инкубацию с L-NNA и зависимость «К-Э» на донор NO DEA-NO (0.001 - 10 мкМ).

**Протокол для исследования реакций расслабления артерий на T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub>.** Зависимости «К-Э» на T<sub>3</sub> или T<sub>4</sub> исследовали на фоне вызванного MX тонического сокращения (60-70% от максимума). T<sub>3</sub> или T<sub>4</sub> добавляли кумулятивно (0.03 – 10 мкМ) с интервалом 10 мин. К контрольным сегментам добавляли эквивалентный объем растворителя ДМСО. В части экспериментов перед зависимостью «К-Э» на T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub> препараты инкубировали 30 мин с IOP (100 мкМ) или эквивалентным объемом ДМСО.

**Протокол для исследования быстрых эффектов  $T_3$  и  $T_4$  на сократительные ответы артерий.** Проводили две последовательные зависимости «К-Э» на МХ. После первой зависимости сегменты инкубировали с растворителем,  $T_3/T_4$  (10 мкМ), различными ингибиторами и их комбинациями с гормонами. Первая зависимость не отличалась между группами во всех сериях экспериментов (то есть препараты обладали сходной реактивностью на МХ), поэтому отличия между вторыми зависимостями были обусловлены влиянием фармакологических агентов. На графиках с результатами экспериментов по данному протоколу представлены именно вторые зависимости «К-Э».

**При обработке результатов** реакцию на агонист в каждой концентрации выражали в процентах от максимальной силы сокращения в первой зависимости «К-Э» (для МХ) или от уровня предсокращения (для АХ, DEA-NO или  $T_3/T_4$ ). Чувствительность препаратов к МХ оценивали по показателю  $EC_{50}$  (концентрация, вызывающая 50% реакцию), вычисления проводили в программе GraphPad Prism 7.0.

**Определение уровня мРНК методом ПЦР-РВ.** Для выделения РНК из образцов артерий проводили гомогенизацию на льду в буфере RLT (Qiagen) с последующей очисткой гомогената на колонках CleanRNA Standard (Евроген, Россия) по протоколу производителя. Затем обрабатывали ДНКазой I (ThermoScientific) и измеряли концентрацию РНК на спектрофотометре Nanodrop 1000 (ThermoScientific). Далее образцы разводили до одинаковой концентрации и проводили обратную транскрипцию при помощи набора MMLV RV kit (Евроген) по инструкции производителя. Полученную кДНК использовали для ПЦР-РВ (праймеры и наборы qPCRmix-HS SYBR, Евроген, Россия, прибор RotorGene 6000, Corbett Life Science). Содержание мРНК рассчитывали как  $E^{-Ct}$ , где  $E$  – эффективность праймеров, а  $Ct$  – номер цикла, на котором кривая накопления продукта пересекает пороговый уровень флуоресценции. Полученные значения нормировали на уровень экспрессии референсных генов в том же образце, усредняли внутри группы и выражали в процентах от среднего значения в контрольной группе.

**Определение содержания белков методом Вестерн блот.** Методику Вестерн блот использовали для определения содержания: (1) D2 в суральных артериях и артериях брыжейки крыс; (2) фосфорилированных форм белков – потенциальных посредников негеномного действия  $T_4$  на суральные артерии. Во втором случае для приготовления образцов использовали сегменты артерий, которые подвергали тем же манипуляциям, что и в экспериментах по регистрации сократительных ответов: растягивали в миографе и проводили стандартную активацию. Далее инкубировали 20 мин с ДМСО или  $T_4$  (10 мкМ) и проводили зависимость «К-Э» на МХ до концентрации 10 мкМ (к части препаратов, инкубированных с ДМСО, добавляли эквивалентный объем  $H_2O$  вместо МХ). После этого образцы быстро замораживали в трихлоруксусной кислоте (15% раствор в ацетоне, на сухом льду) на 3 ч, отмывали в ацетоне (1 ч), высушивали и хранили при  $-70^{\circ}C$  до

проведения анализа. Методики гомогенизации образцов, гель-электрофореза и полусухого переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану подробно описаны в статье (Selivanova et al., 2021).

Мембраны разрезали на части в соответствии с молекулярной массой белков интереса, после чего инкубировали 1 ч в 5% обезжиренном молоке в растворе TBSt (20 mM трис-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20). Затем проводили 16-18 ч инкубацию при +4°C с антителами к D2 (Abcam, 1:1000), GAPDH (любезно предоставлены проф. А.Г.Катрухой, 1:2000),  $\beta$ -актину (Cell Signaling, 1:2000), pMLC2 (Ser19, Cell Signaling, 1:1000). Далее мембраны отмывали в TBSt буфере и инкубировали 50 мин при комнатной температуре со вторичными антителами (antimouse 1:5000 или antirabbit 1:10000, оба антитела – Cell Signaling). Для детекции хемилюминесценции использовали раствор Supersignal West Femto ECL (Thermo Scientific) и систему ChemiDoc (Bio Rad), обработку результатов проводили в программе ImageLab Software (Bio Rad). Уровень флуоресценции нормировали на сигнал  $\beta$ -актина или GAPDH в том же образце на другой части мембраны или на общую окраску мембраны Ponceau (Romero-Calvo et al., 2010).

**Статистический анализ результатов.** Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.) с использованием критериев Шапиро-Уилка, двухфакторного и однофакторного дисперсионного и рекомендуемого апостериорного анализов, критерия Стьюдента и критерия Манна-Уитни. Уровень статистической значимости был равен 0.05. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего, n – количество животных в группе.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Регуляция экспрессии D2 в резистивных артериях *in vivo*

**Хронический гипертиреоз приводит к подавлению экспрессии мРНК D2 в суральной артерии крысы.** Избыток T<sub>3</sub> не влиял на уровень мРНК TR $\alpha$ 1, основных ядерных рецепторов тиреоидных гормонов в сосудах (Hiroi et al., 2006) (рис. 1А), однако в артериях крыс с гипертиреозом наблюдалось выраженное снижение содержания мРНК D2 (рис. 1Д). Уровень белка D2 при этом не изменялся, что может быть связано с увеличением времени полужизни белка D2 в результате ослабления влияния T<sub>4</sub> (Gereben et al., 2008) или же с влиянием дополнительных факторов, изменяющихся при гипертиреозе. Таким образом, в артериях T<sub>3</sub> оказывает негативное влияние на экспрессию D2 на транскрипционном уровне. Полученные результаты согласуются с данными о негативном действии T<sub>3</sub> на содержание мРНК D2 в других тканях, например, нервной ткани (Burmeister et al., 1997), однако для артерий в условиях *in vivo* такая закономерность показана нами впервые.

**Хроническая неонатальная десимпатизация приводит к подавлению экспрессии мРНК D2 в суральной артерии крысы.** Нарушение симпатической иннервации не влияло на уровень мРНК TR $\alpha$ 1 (рис. 1Б), но приводило к снижению содержания мРНК D2 (рис. 1Г) и белка D2 (на уровне

тенденции,  $p=0.112$  по критерию Манна-Уитни, данные не представлены) в суральной артерии. Уровень экспрессии мРНК D2 в артериях брыжейки был втрое ниже, чем в суральной артерии, и не изменялся при десимпатизации (данные не представлены). Таким образом, симпатические влияния положительно регулируют экспрессию мРНК D2 в артериях, однако их действие имеет регионарную специфичность.

**Хроническое подавление синтеза NO не влияет на экспрессию D2 в суральной артерии крысы.** Потребление L-NAME не привело к значимым изменениям уровней экспрессии TR $\alpha$ 1 и D2 (рис. 1В,Е) как в суральных, так и в брыжеечных артериях. Содержание белка D2 в суральных артериях также не изменялось (данные не представлены). Можно заключить, что экспрессия мРНК D2 в артериях не зависит от уровня продукции NO.

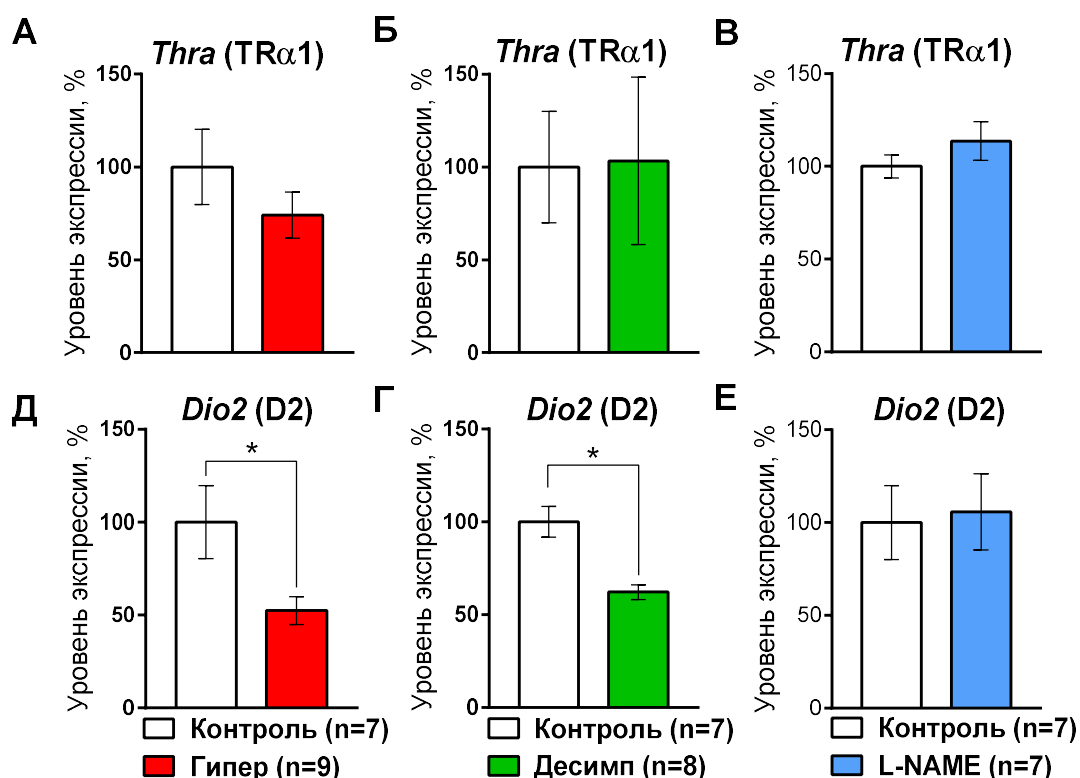


Рис.1. Относительное содержание мРНК ядерных рецепторов тиреоидных гормонов (*Thra*, А, Б, В) и дейодиназы 2 типа (*Dio2*, Д, Г, Е) в суральной артерии в моделях гипертиреоза (А, Д), неонатальной десимпатизации (Б, Г) и подавления синтеза NO (В, Е). Данные нормированы на уровень экспрессии *Actb* и *Gapdh* (среднее геометрическое, А, Д), *Rn18s* (Б, Г), *Rplp0* (В,Е). Среднее значение в группе контрольных крыс принято за 100%. \* -  $p < 0.05$  (непарный критерий Стьюдента).

Нужно отметить, что во всех использованных нами довольно «жестких» экспериментальных моделях происходило изменение экспрессии мРНК D2, но не TR $\alpha$ 1. Такая лабильность уровня D2 предполагает, что этот фермент играет важную роль в регуляции интенсивности действия тиреоидных гормонов на сосуды.

## Роль D2 в регуляции тонуса артерий скелетных мышц

**Подавление активности D2 приводит к ослаблению вазомоторной роли NO в суральной артерии крысы.** Культивирование в течение 12 ч в присутствии ингибитора D2 иопаноевой кислоты (IOP) (Coppola et al., 2005), T<sub>4</sub> и T<sub>4</sub>+IOP не оказало значимого влияния на исходные реакции сокращения (первая зависимость «К-Э» на МХ) и эндотелий-зависимого расслабления артерий (первая зависимость «К-Э» на АХ). Для выявления возможных изменений в NO-зависимой регуляции вазомоторных ответов проводили инкубацию препаратов с ингибитором NO-синтаз L-NNA, после чего повторяли зависимости «К-Э» на МХ и АХ (рис.2).

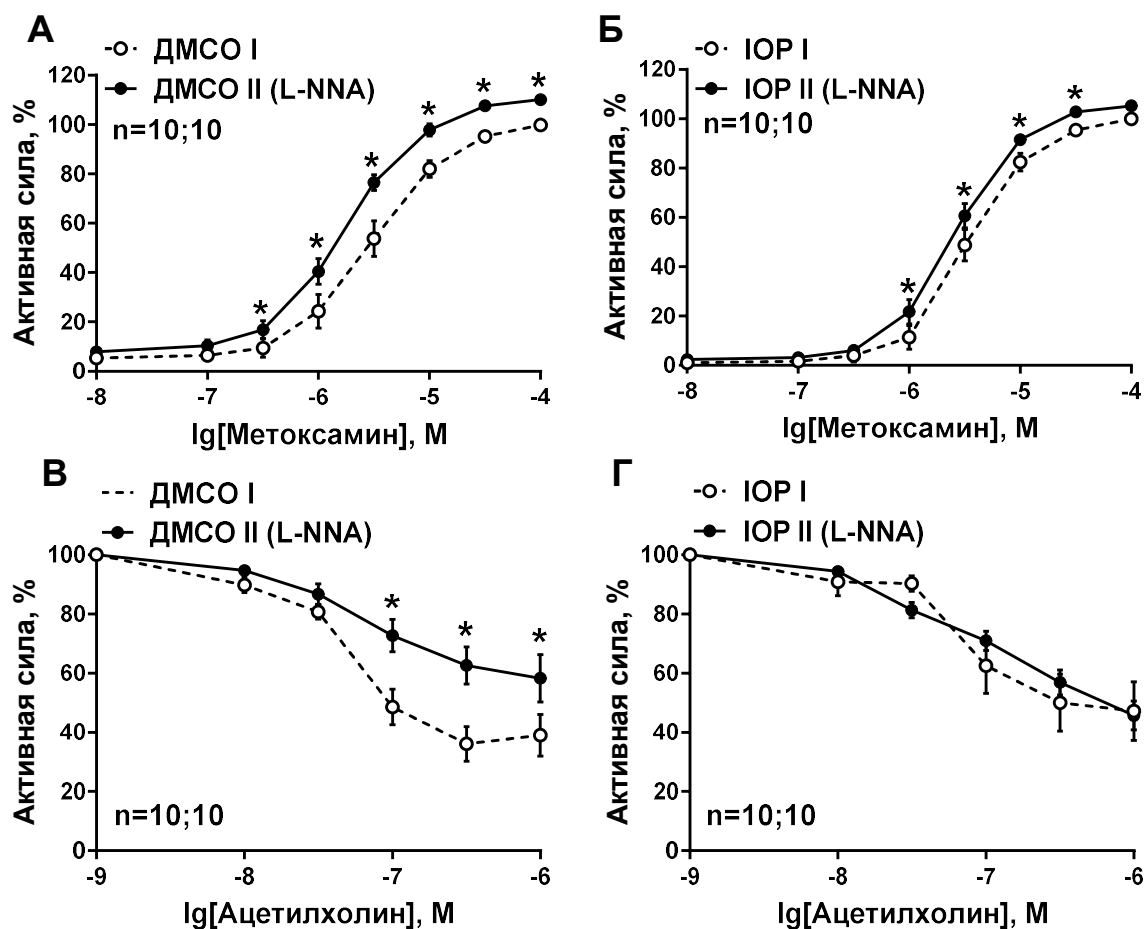


Рис.2. Влияние блокады синтеза NO при помощи L-NNA (100 мкМ) на сократительные ответы на метоксамин (А, Б) и реакции расслабления на ацетилхолин (В, Г) препаратов суральной артерии после 12-ч культивирования в присутствии: А, В – растворителя (ДМСО), Б, Г – ингибитора 5'-дейодирования иопаноевой кислоты (IOP, 100 мкМ). I – реакции до инкубации с L-NNA, II - реакции после инкубации с L-NNA. \* -  $p < 0.05$  (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Сидака).

Подавление синтеза NO приводило к увеличению сократительных ответов на МХ артерий, культивированных с ДМСО (рис. 2А), показатель  $EC_{50}$  снижался от  $3.47 \pm 0.63$  до  $1.91 \pm 0.21$  мкМ ( $p < 0.05$ ). В артериях, культивированных с IOP, влияние L-NNA на реакции артерий было менее выраженным (рис. 2Б), значение  $EC_{50}$  не изменялось ( $3.81 \pm 0.73$  и  $2.73 \pm 0.44$  мкМ,  $p > 0.05$ ). Аналогичные результаты были получены для артерий, культивированных с  $T_4$  или с комбинацией  $T_4$ +IOP (данные не представлены). Уменьшение вазомоторного влияния NO было показано и при оценке реакций расслабления артерий на АХ: L-NNA уменьшал реакции артерий в группах ДМСО (рис. 2В) и  $T_4$ , но не влиял на реакции артерий в группах IOP (рис. 2Г) и  $T_4$ +IOP. Следует отметить, что реакции расслабления на DEA-NO, характеризующие NO-чувствительность гладкой мышцы, не различались у четырех групп артерий (данные не представлены).

Таким образом, мы впервые показали, что культивирование артерий с ингибитором D2 IOP изменяет вазомоторные реакции сосудов, что подразумевает сохранение активности D2 в культивируемых артериях. Это предполагает, что в ткани артерий, выделенных из организма крысы, содержится «остаточный»  $T_4$ , который под действием D2 может превращаться в  $T_3$ . В свою очередь,  $T_3$  способен активировать продукцию NO. Нужно отметить, что добавление дополнительного  $T_4$  в среду для культивирования не привело к увеличению влияния NO на реакции сосудов, что может быть связано с низкой концентрацией гормона (всего 50 пМ) или с недостатком в среде для культивирования тиоловых кофакторов, которые могут существенно повышать активность D2 (Germain, 1988).

Полученные результаты позволяют заключить, что активность D2 в стенке артерий икроножной мышцы необходима для увеличения внутриклеточной концентрации  $T_3$  и поддержания вазомоторной роли NO.

***Подавление активности D2 приводит к уменьшению содержания мРНК D2 и генов-мишеней геномного действия тиреоидных гормонов.***

Культивирование суральных артерий в присутствии IOP приводило к значимому снижению содержания мРНК D2 (рис. 3А), но не влияло на уровень мРНК рецепторов  $TR\alpha 1$  (рис. 3Б).

IOP подавляет активность D2, ответственную за внутриклеточную продукцию  $T_3$  (Tusa et al., 1994), что должно сопровождаться уменьшением экспрессии  $T_3$ -зависимых генов. В соответствии с этим, мы обнаружили снижение содержания мРНК  $T_3$ -зависимых генов  $\alpha$ -актина (*Acta2*) (Wang, Sun, 2010) и *Serca2* (*Atp2a2*) (Hartong et al., 1994) (рис. 3В,Г). Это подтверждает наше предположение, что культивирование суральных артерий с IOP сопряжено с уменьшением внутриклеточной концентрации  $T_3$ . Следует отметить, что в суральной артерии крысы экспрессируется только D2 (экспрессии D1 и D3 нами выявлено не было, данные не представлены, эффективность праймеров была подтверждена с использованием образцов печени и мозга, соответственно), то есть влияние IOP было направлено именно на D2.

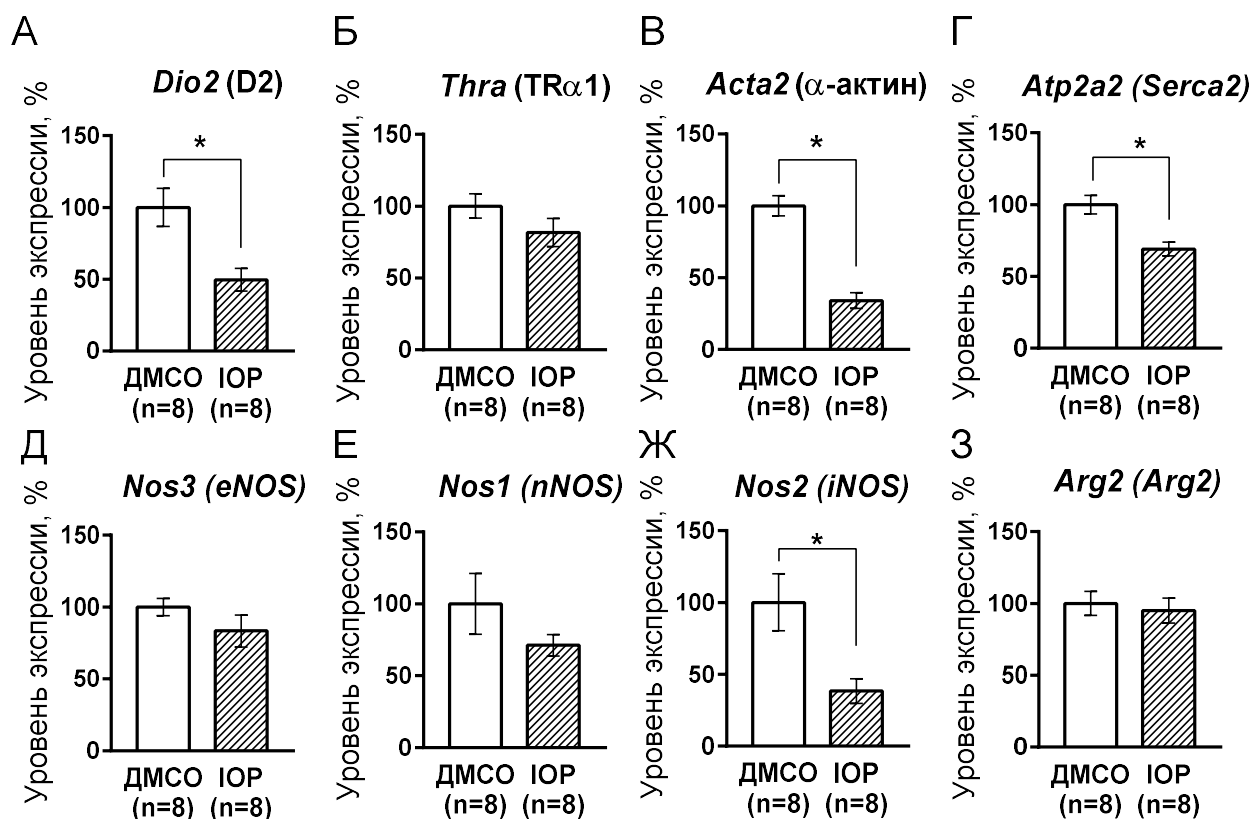


Рис. 3. Влияние культивирования в присутствии растворителя (ДМСО) или ингибитора 5'-дейодирования иопаноевой кислоты (ИОР, 100 мкМ) на относительное содержание мРНК генов в суральной артерии крысы. Над диаграммами приведены названия генов и кодируемых ими белков. Данные нормированы на уровень экспрессии *Actb*. Средний уровень экспрессии генов в группе ДМСО принят за 100%. \* -  $p < 0.05$  (непарный критерий Стьюдента).

**Подавление активности D2 приводит к уменьшению содержания мРНК индуцибельной, но не других изоформ NO-синтазы.** Культивирование в присутствии ИОР не влияло на содержание мРНК eNOS и nNOS (рис.3 Д, Е), но вызывало снижение мРНК iNOS (рис.3 Ж). Экспрессия мРНК аргиназы-2 (*Arg2*), конкурирующей с NO-синтазами за общий субстрат L-аргинин, также не изменялась (рис. 3 З).

Изменение продукции NO, опосредованное iNOS, может служить одной из причин ослабления тонического влияния NO на сократительные ответы сосудов, культивированных с ингибитором D2. Однако эндотелий-зависимое расслабление сосудов в ответ на АХ связано с активацией eNOS (Гайнуллина и др., 2013; Chataigneau et al., 1999). Вероятно, уменьшение роли NO в эндотелий-зависимом расслаблении артерий, культивированных с ИОР, связано с ослаблением негеномного действия  $T_3$  на eNOS. Показано, что  $T_3$  может увеличивать продукцию NO в культуре эндотелиальных клеток в течение нескольких минут после аппликации за счет связывания с TR $\alpha$ 1 и фосфоинозитид-3-киназой в цитоплазме и последующего фосфорилирования eNOS (Hiroi et al., 2006), причем этот механизм также может зависеть от



активности D2 (Aoki et al., 2015). Таким образом, активность D2 в артериях скелетных мышц необходима для поддержания вазомоторной роли NO. Вероятно, T<sub>3</sub>, продуцируемый D2, стимулирует продукцию NO в артериях за счет геномного (увеличения экспрессии iNOS) и негеномного (увеличение активирующего фосфорилирования eNOS) механизмов действия.

### **Механизмы негеномного влияния тиреоидных гормонов на тонус артерий икроножной мышцы**

*T<sub>4</sub> вызывает более выраженное быстрое расслабление суральной артерии, чем T<sub>3</sub>.* В третьей части работы мы исследовали механизмы быстрого негеномного действия тиреоидных гормонов на тонус артерий. Апликация T<sub>3</sub> или T<sub>4</sub> в возрастающих концентрациях с 10-мин интервалами вызывала дозозависимое расслабление предварительно сокращенных сегментов артерий икроножной мышцы (рис. 4А,Б). На оригинальной записи видно, что реакция наблюдалась уже через несколько минут после добавления гормона (рис. 4А), что позволяет считать эффект негеномным, так как для проявления геномных эффектов необходимо несколько часов (Kasahara et al., 2006; Tamajusuku et al., 2006). Эффект T<sub>4</sub> был более выраженным, чем эффект T<sub>3</sub>, и проявлялся в присутствии ингибитора D2 IOP, то есть не был связан с превращением T<sub>4</sub> в T<sub>3</sub> (рис. 4В).

Нужно отметить, что в экспериментах по данному протоколу наблюдался спонтанный спад тонуса препаратов (рис. 4Б, «ДМСО»), что затрудняло количественную оценку реакций. В связи с этим для выявления механизмов быстрого негеномного действия T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> использовали протокол с двумя последовательными зависимостями «К-Э» на МХ. Перед второй зависимостью артерии инкубировали с T<sub>3</sub> или T<sub>4</sub> (10 мкМ) в течение 20 минут. Выраженность вызванного гормонами расслабления оценивали по уменьшению сократительных ответов на МХ после инкубации (Рис. 5А,Б). Использование довольно высокой концентрации гормонов (10 мкМ) связано с изометрическим режимом регистрации сократительных ответов артерий. Известно, что в методике wire myograph чувствительность препаратов к различным агонистам может быть на несколько порядков ниже, чем в изобарических условиях (Buus et al., 1994; Dunn et al., 1994). В отношении тиреоидных гормонов это подтверждается данными литературы: при исследовании негеномного влияния тиреоидных гормонов на сосуды в условиях, более приближенных к физиологическим (таких как перфузия коронарного русла или регистрация диаметра сосудов *in vivo*) T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> вызывают расширение сосудов в более близких к физиологическим концентрациях: порядка 10-100 нМ (Colantuoni et al., 2005; Yoneda et al., 1998).

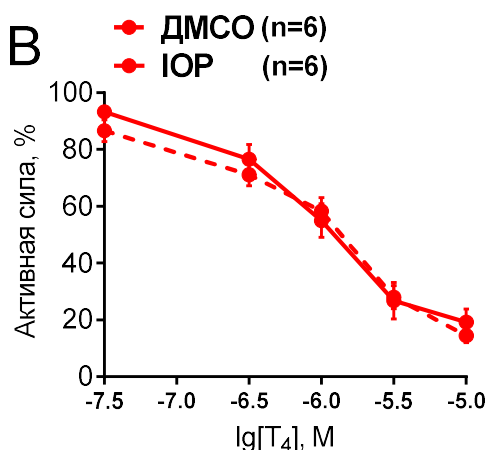
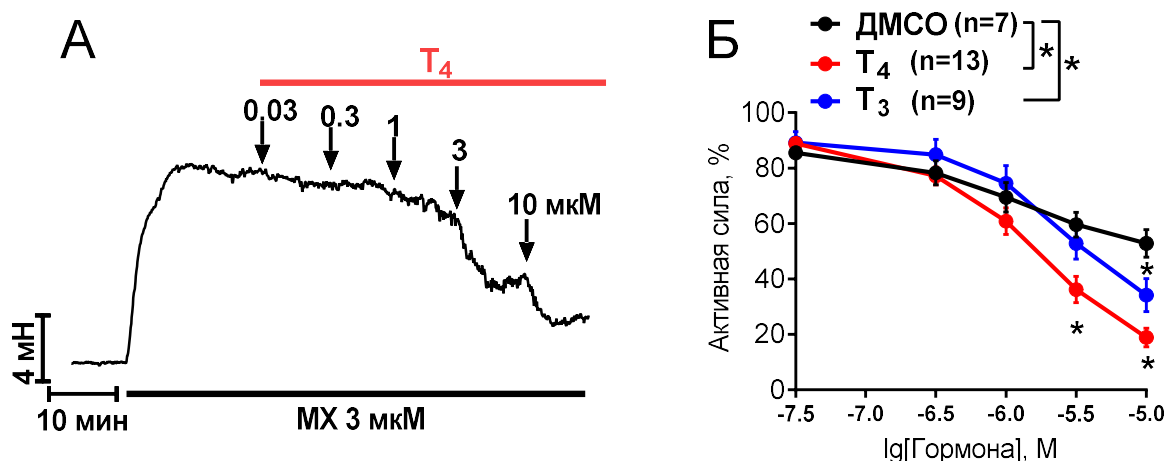


Рис.4. Быстрые эффекты T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> на предсокращенные метоксамином артерии икроножной мышцы. А. Оригинальная запись вызванного T<sub>4</sub> дозозависимого расслабления артерии. Б. Сравнение выраженности эффектов T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub>. В. Влияние ингибитора дейодиназы 2 типа (IOP, 100 мкМ) на вызванную T<sub>4</sub> вазодилатацию. \* - p<0.05 по сравнению с группой ДМСО (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки).

**Расслабление суральной артерии крысы под влиянием T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> опосредовано разными механизмами.** Инкубация с T<sub>3</sub> приводила к ослаблению вызванного МХ сокращения только в артериях с интактным, но не с удаленным эндотелием (рис. 5 А,В). Зависимость эффекта T<sub>3</sub> от эндотелия согласуется с данными литературы: аналогичные наблюдения были сделаны в экспериментах на аорте (Lozano-Cuenca et al., 2016), артериях тонкого кишечника (Geist et al., 2021) и артериолах скелетных мышц (Park et al., 1997). Скорее всего, эндотелий-зависимое негеномное действие T<sub>3</sub> связано с повышением активности eNOS в результате связывания гормона с TRα1 и фосфоинозитид-3-киназой в цитоплазме (Geist et al., 2021; Hiroi et al., 2006).

Интересно, что эффект T<sub>4</sub> не зависел от эндотелия (рис. 5 Б,Д). Так как T<sub>4</sub> традиционно считается менее активной формой тиреоидных гормонов, чем T<sub>3</sub>, исследования механизмов расслабления артерий, вызванного T<sub>4</sub>, ранее практически не проводились. Поэтому в дальнейшей части работы мы сосредоточились именно на механизмах негеномного влияния T<sub>4</sub>.

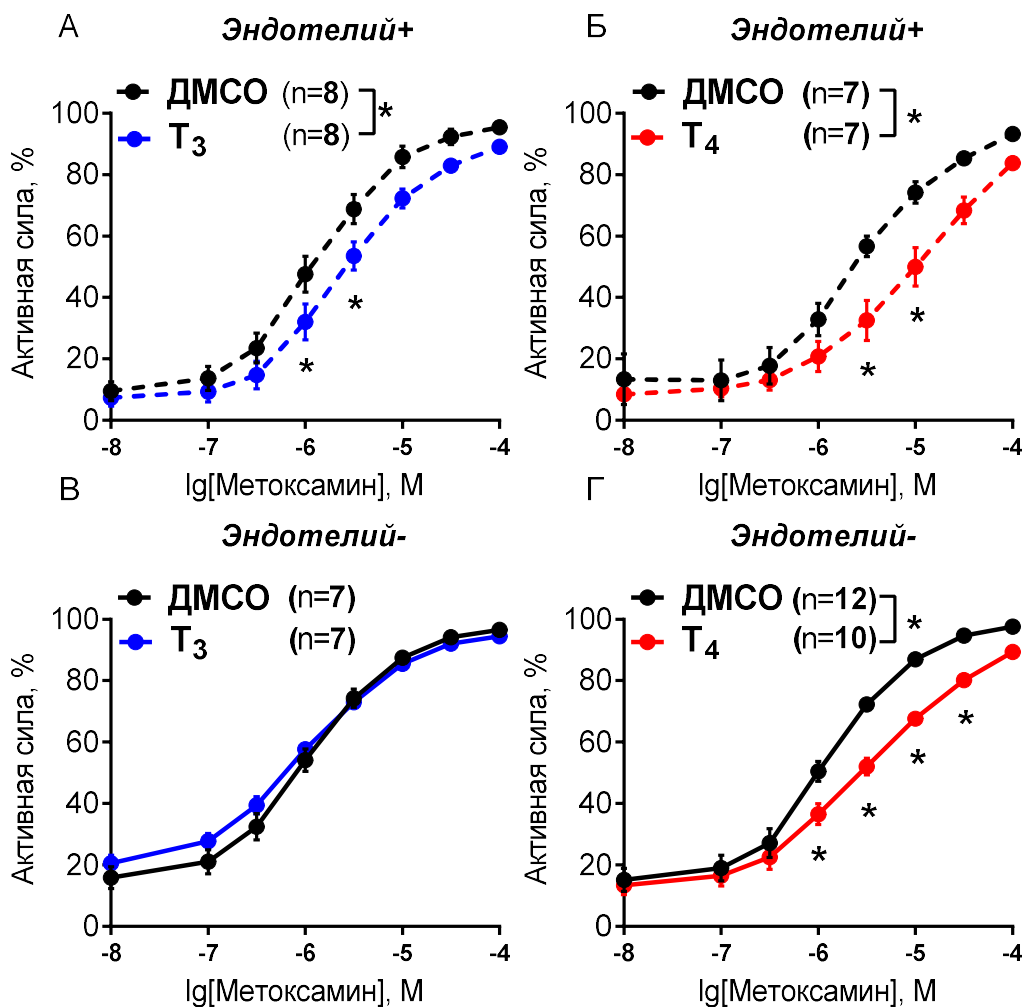


Рис. 5. Зависимости «К-Э» на метоксаметин артерий с интактным (А, Б) или удаленным (В, Г) эндотелием в присутствии растворителя и Т<sub>3</sub> (А, В) или Т<sub>4</sub> (Б, Г). \* -  $p < 0.05$  по сравнению с группой ДМСО (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки).

*Расслабление суральной артерии под влиянием Т<sub>4</sub> опосредовано интегрином  $\alpha\upsilon\beta 3$  и связано с уменьшением уровня фосфорилирования легких цепей миозина.* Для идентификации молекулярных посредников эндотелий-независимого негеномного действия Т<sub>4</sub> проводили ингибиторный анализ сократительных ответов артерий с удаленным эндотелием. В присутствии блокатора сайта связывания тиреоидных гормонов интегрин  $\alpha\upsilon\beta 3$  тетрака (дезаминированное производное Т<sub>4</sub>, тетраодотироуксусная кислота) Т<sub>4</sub> не подавлял сократительные ответы артерий на МХ (Рис. 6А,Б). Таким образом, мы впервые показали, что интегрин  $\alpha\upsilon\beta 3$  опосредует расслабление артерий при негеномном влиянии Т<sub>4</sub>. Мы также показали, что Т<sub>4</sub> ослабляет вызванный МХ прирост уровня фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина MLC2 (Ser19) (Рис. 7).

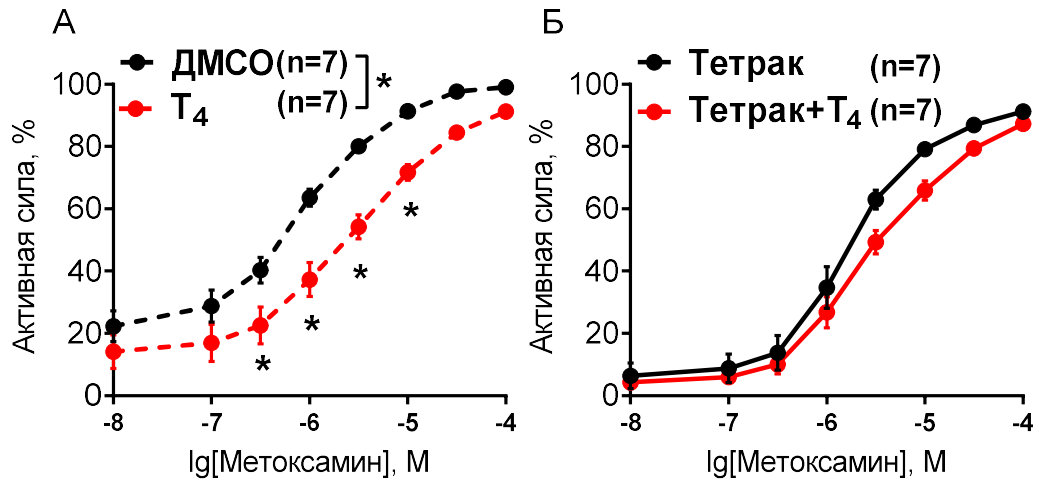


Рис.6. Блокатор интегрин  $\alpha\upsilon\beta 3$  тетрак устраняет вызванное T<sub>4</sub> подавление сократительных ответов артерий икроножной мышцы на метоксамин. Зависимости «К-Э» на метоксамин после инкубации артерий с удаленным эндотелием с T<sub>4</sub> или растворителем в отсутствие (А) или в присутствии (Б) тетрака (3 мкМ). \* -  $p < 0.05$  по сравнению с группой ДМСО (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки).

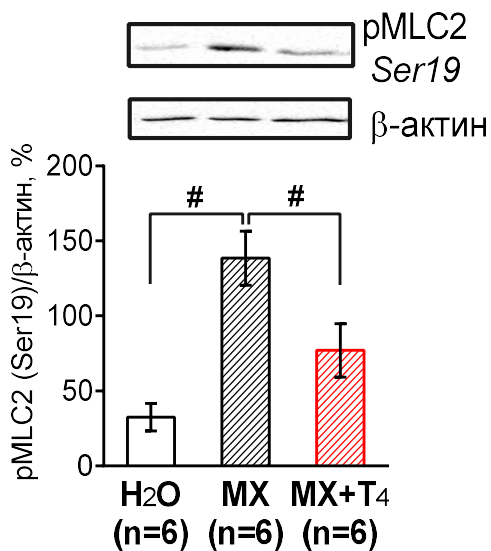


Рис.7. T<sub>4</sub> (10 мкМ) ослабляет вызванный метоксамином (MX, 10 мкМ) прирост уровня фосфорилирования легких цепей миозина (pMLC2, Ser19). Данные нормированы на содержание β-актина в том же образце, за 100% принято среднее значение для 2 образцов артерий брыжейки, которые присутствовали на каждой мембране. # -  $p < 0.05$  (однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Даннета).

В соответствии с полученными данными, негеномное действие T<sub>4</sub> на артерии суральных мышц обусловлено взаимодействием гормона с интегрином  $\alpha\upsilon\beta 3$  и связано с уменьшением уровня фосфорилирования MLC2.

**Расслабление суральной артерии под влиянием T<sub>4</sub> опосредовано ERK1/2 и ILK.** Дальнейший поиск молекулярных участников, опосредующих эффект T<sub>4</sub> в гладкой мышце, проводился по следующим критериям: (1) наличие функциональной связи с интегрином  $\alpha\upsilon\beta 3$ ; (2) способность напрямую или опосредованно влиять на уровень фосфорилирования MLC2 (Ser19). По результатам литературного анализа на роль промежуточных

посредников инициируемого  $T_4$  сигнального каскада были выбраны следующие протеинкиназы: ERK1/2, интегрин-связанная киназа ILK, Src- и Rho-киназа (Flamini et al., 2017; Friedrich et al., 2006; Knock et al., 2008; Rucci et al., 2005; Samarakoon et al., 2011). Далее исследовали влияние ингибиторов этих протеинкиназ на способность  $T_4$  подавлять сократительные ответы артерий с удаленным эндотелием.

$T_4$  не подавлял сократительные ответы артерий в присутствии ингибитора MEK1/2, активирующей ERK1/2 (U0126, 10 мкМ) (рис. 8А), тогда как U0124 (неактивный аналог U0126, 10 мкМ) не оказывал влияние на эффект  $T_4$  (данные не представлены).

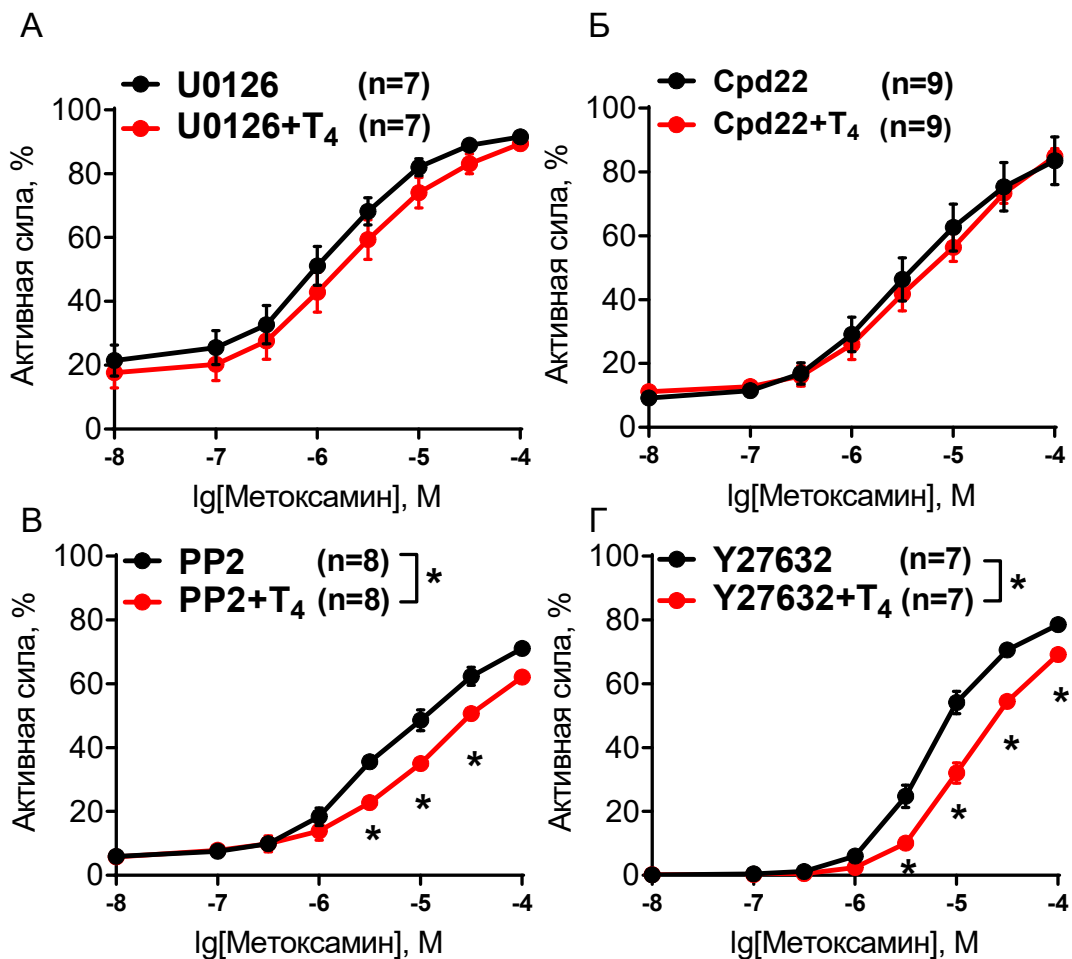


Рис.8. Ингибиторы ERK1/2 (U0126) и ILK (Cpd22), но не Src- (PP2) и Rho-киназы (Y27632) устраняют вызванное  $T_4$  подавление сократительных ответов артерий икроножной мышцы на метоксамин. Зависимости «К-Э» на метоксамин после инкубации артерий с удаленным эндотелием с  $T_4$  или растворителем в присутствии (А) U0126 (10 мкМ) (Б) Cpd22 (10 мкМ), (В) PP2 (10 мкМ), (Г) Y27632 (10 мкМ). Неактивные аналоги U0126 (U0124, 10 мкМ) и PP2 (PP3, 10 мкМ), а также эквивалентный объем растворителя ДМСО не влияли на вызванное  $T_4$  подавление сократительных ответов на метоксамин. \* -  $p < 0.05$  (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки).

Ингибитор ILK (Cpd22, 10 мкМ) также устранял вазорелаксирующее влияние  $T_4$  (рис. 8Б). Вместе с тем эффект  $T_4$  был выражен в присутствии ингибитора Src-киназы PP2 (рис. 8В), а также его неактивного аналога PP3 (данные не представлены). На фоне действия ингибитора Rho-киназы Y27632  $T_4$  также был способен уменьшать сократительные ответы артерий (рис. 8Г).

Можно заключить, что в реализации вызванного  $T_4$  расслабления участвуют протеинкиназы ERK1/2 и ILK, но не Src- и Rho-киназа.

**Предполагаемый механизм расслабления гладкой мышцы артерий под действием  $T_4$ .** Поскольку повышение активности протеинкиназ ERK1/2 и ILK приводит к сокращению гладкомышечных клеток (D'Angelo 2002; Gaynullina et al., 2021; Ihara et al., 2007), мы предполагаем, что в ходе негеномного действия  $T_4$  подавляет активность ERK1/2 и ILK (рис. 9).

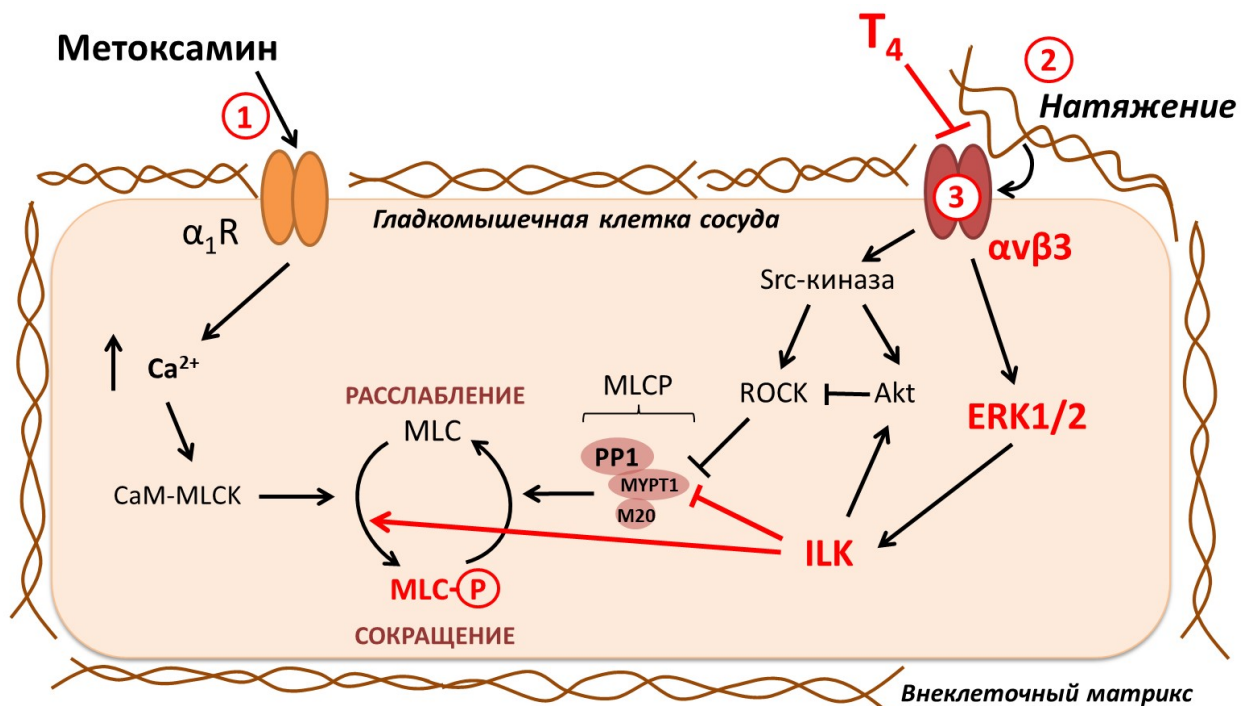


Рис. 9. Возможные сигнальные пути, опосредующие негеномное расслабление гладкомышечных клеток артерий скелетных мышц под действием  $T_4$ .  $T_4$  вызывает независимое от эндотелия расслабление за счет подавления интегриновой сигнализации в ответ на растяжение внеклеточного матрикса. 1 – сокращение в ответ на агонист  $\alpha_1$ -адренорецепторов метоксамин вызывает натяжение в стенке артерии; 2 – натяжение внеклеточного матрикса активирует интегрин  $\alpha v \beta 3$  и запускает сигнальный каскад, вызывающий активацию ERK1/2 и ILK, в результате которого изменяется уровень фосфорилирования легких цепей миозина; 3 –  $T_4$  связывается с интегрином и нарушает его взаимодействие с внеклеточным матриксом, ослабляя сигнал и вызванное метоксамином сокращение. Ключевые молекулы, опосредующие негеномное действие  $T_4$ , выделены красным. На схеме также показаны другие, пока не подтвержденные экспериментально, гипотетические участники интегриновой сигнализации. Острые стрелки отражают активацию, тупые – ингибирование мишени.  $\alpha_1R$  –  $\alpha_1$ -адренорецептор, CaM – кальмодулин, MLC – регуляторные легкие цепи миозина MLC2, MLCK – киназа легких цепей миозина, MLCP – фосфатаза легких цепей миозина, MYPT1, PP1, M20 – субъединицы фосфатазы легких цепей миозина, ROCK – Rho-киназа.

При сокращении гладкомышечных клеток происходит увеличение натяжения сосудистой стенки (Takamizawa et al., 1992), что может активировать интегрин  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ , который, в свою очередь, запускает сигнальный каскад снаружи-внутри (Chen et al., 2017; Zeller et al., 2013). В результате этого каскада происходит активация ERK1/2 и ILK, и сокращение усиливается. Нужно отметить, что роль этих киназ была проанализирована нами в отдельных экспериментах, что не позволяет определить порядок их активации под действием  $T_4$ . Тем не менее, можно предположить, что ERK1/2 расположены в сигнальном каскаде перед ILK. Это предположение основано на том, что именно ILK способна влиять на степень фосфорилирования MLC2 (Deng et al., 2001; Wilson et al., 2005), тогда как для ERK1/2 такое влияние не характерно (Воротников и др., 2009). Кроме того, последовательная активация ERK1/2 и ILK была обнаружена в гладкой мускулатуре пищеварительного тракта (Harnett et al., 2005; Ihara et al., 2007).

Известно, что сайт связывания  $T_4$  с интегрином  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  частично перекрывается с местом связывания внеклеточного матрикса (Cody et al., 2007; Freindorf et al., 2012). Мы предполагаем, что присоединение  $T_4$  к интегрину ослабляет его взаимодействие с матриксом, и таким образом уменьшает интенсивность посылаемого им внутрь клетки проконтрактивного сигнала.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе впервые было проведено комплексное исследование различных аспектов тиреоидной регуляции резистивных артерий крыс. В условиях *in vivo* нам удалось выявить ряд закономерностей регуляции экспрессии D2 в резистивных сосудах. Результаты работы позволяют заключить, что экспрессия D2, а значит, и интенсивность геномного действия тиреоидных гормонов в резистивных артериях изменяется в зависимости от концентрации  $T_3$  в крови и симпатических влияний, но не зависит от уровня продукции NO. Однако анализ результатов, полученных в экспериментах *in vivo*, может быть затруднен из-за системных изменений. Более однозначные выводы можно будет сделать из дальнейших исследований, проведенных в более стандартизованных условиях, например, с применением методики культивирования сегментов сосудов.

Благодаря использованию метода культивирования мы впервые показали, что активность D2 необходима для NO-зависимой регуляции тонуса артерий скелетных мышц за счет стимуляции превращения  $T_4$  в  $T_3$ . Поддержание необходимого уровня продукции NO обеспечивается геномным механизмом  $T_3$ -зависимой регуляции экспрессии iNOS и, вероятно, негеномным  $T_3$ -зависимым механизмом регуляции активности eNOS. Исходя из этого, можно предположить, что активность D2 необходима для усиления не только геномного, но и негеномного действия тиреоидных гормонов на сосуды.

Мы также изучили механизмы негеномного действия тиреоидных гормонов на тонус артерий икроножной мышцы крыс, в результате идентифицировали ключевых участников сигнального каскада, опосредующего релаксирующее влияние  $T_4$  на гладкомышечные клетки сосудов и предложили гипотетический механизм влияния  $T_4$  на систему механотрансдукции в гладкомышечных клетках. Эти результаты существенно развивают современные представления о механизмах негеномного влияния тиреоидных гормонов. Следует отметить, что концентрация  $T_4$  в крови во много раз выше, чем  $T_3$  (Gaynullina et al., 2018; Ortiga-Carvalho et al., 2016), что предполагает высокую физиологическую значимость быстрого негеномного вазомоторного влияния  $T_4$ . В частности, обнаруженный нами эффект  $T_4$  может вносить вклад в снижение периферического сопротивления сосудов, наблюдаемого при гипертиреозе (Klein, 1990).

В целом можно заключить, что тиреоидные гормоны необходимы для поддержания нормального функционирования сосудов, причем их регуляторные влияния на артерии реализуются как по геномному, так и по негеномному механизмам. Нужно отметить, что геномные и негеномные эффекты в клетке часто взаимодействуют, дополняя эффекты друг друга. Классическим примером такого дополняющего, качественно сходного взаимодействия является тиреоидная регуляция работы митохондрий. В этом случае  $T_3$  способен вызывать быстрое увеличение потребления  $O_2$  и синтеза АТФ за счет негеномного механизма, а затем связываться с ядерными рецепторами и действовать на геномном уровне, вызывая долговременное увеличение экспрессии митохондриальных белков и стимуляцию митохондриального биогенеза (Lee et al., 2012; Pessemesse et al., 2014; Weitzel, Iwen, 2011). При тиреоидной регуляции тонуса артерий мы наблюдаем сходную схему взаимодействия геномных и негеномных эффектов  $T_3$  и  $T_4$ , направленных на подавление сократительных ответов сосудов. Тиреоидные гормоны могут вызывать быстрое негеномное расслабление сосудов:  $T_4$  – путем подавления интегриновой сигнализации, а  $T_3$  – по эндотелий-зависимому механизму. Более длительное геномное действие внутриклеточно продуцируемого  $T_3$  необходимо для поддержания тонического вазодилатирующего влияния NO в сосудистом русле. В итоге совокупность вазомоторных эффектов тиреоидных гормонов обеспечивает как краткосрочное, так и более долговременное расширение сосудов и снижение общего периферического сопротивления.



## ВЫВОДЫ

- 1) Уровень экспрессии мРНК дейодиназы 2 типа в резистивных артериях скелетных мышц крысы снижается при хроническом повышении концентрации  $T_3$  в крови и долговременном устранении симпатических влияний. Оксид азота не влияет на экспрессию дейодиназы 2 типа в артериях.
- 2) Подавление активности дейодиназы 2 типа приводит к уменьшению влияния оксида азота на реакции сокращения и эндотелий-зависимого расслабления артерий скелетных мышц крысы.
- 3) При негеномном влиянии  $T_4$  вызывает более выраженное расслабление артерий скелетных мышц по сравнению с  $T_3$ .
- 4) Расслабление артерий скелетных мышц при негеномном влиянии  $T_3$  опосредовано эндотелием. Негеномное вазомоторное действие  $T_4$  реализуется на уровне гладкой мышцы с участием интегрин  $\alpha\beta_3$ , а также протеинкиназ ERK1/2 и ILK и связано с уменьшением уровня фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина по остатку Ser19.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи, опубликованные в журналах Scopus, Web of Science, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06 по специальности 03.03.01 – Физиология:

1. Selivanova E.K., Gaynullina D.K., Tarasova O.S. Thyroxine induces acute relaxation of rat skeletal muscle arteries via integrin  $\alpha\beta_3$ , ERK1/2 and integrin-linked kinase // *Frontiers in Physiology* – 2021. – V. 12. – 726354. (Scopus, WoS, IF = 4.566)
2. Selivanova E. K., Tarasova O. S. Nongenomic effects of thyroid hormones: their role in regulation of the vascular system // *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. — 2020. — Vol. 75, no. 4. — P. 189–197. (Scopus, IF = 0.77)
3. Borzykh A.A., Selivanova E.K., Shvetsova A.A., Kuzmin I.V., Martyanov A.A., Nesterenko A.M., Tarasova O.S. Changes in the expression of genes regulating calcium homeostasis in rat myocardium induced by voluntary wheel training: The role of thyroid hormones // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. — 2020. — Vol. 14, no. 1. — P. 67–73. (Scopus, IF = 0.69)
4. Гайнуллина Д.К., Селиванова Е.К., Шарова А.П., Тарасова О.С. Повышение констрикторного влияния rho-киназы в артериях скелетных мышц и сердца при хроническом гипотиреозе у крыс // *Бюллетень сибирской медицины/Bulletin of Siberian medicine*. — 2018. — Т. 17, № 4. — С. 23–32. (Scopus, IF = 0.3)
5. Sofronova S.I., Gaynullina D.K., Shvetsova A.A., Borzykh A.A., Selivanova E.K., Kostyunina D.S., Sharova A.P., Martyanov A.A., Tarasova O.S. Antenatal/early postnatal hypothyroidism alters arterial tone regulation in 2-week-old rats // *Journal of Endocrinology*. – 2017. – V. 235. – №2. – P. 137–151. (Scopus, WoS, IF = 4.286)

### **Тезисы докладов в рецензируемых журналах**

1. **Selivanova E.**, Gaynullina D., Tarasova O. Nongenomic thyroxine-induced relaxation of rat skeletal muscle arteries is mediated by integrin  $\alpha\beta_3$ , integrin-linked kinase, ERK1/2 and ROCK // FASEB Journal. — 2021. — Vol. 35, no. S1. (Scopus, WoS, IF = 5.191)
2. **Selivanova E.K.**, Gaynullina D.G., Tarasova O.S. Endothelium and rho-kinase are not essential for nongenomic relaxatory effects of thyroxine in rat skeletal muscle arteries // Acta Physiologica. — 2019. — Vol. 227, no. S721. — P. e13413–e13414. (Scopus, WoS, IF = 6.311)

### **Статьи в сборниках**

1. **Селиванова Е. К.**, Швецова А.А., Гайнуллина Д.К., Тарасова О.С. Активность дейодиназы 2 типа необходима для поддержания продукции оксида азота в артериях скелетных мышц крысы // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей.— Т. 1. — Типография Пятый формат Серпухов, 2021. — С. 130–135.
2. **Селиванова Е.К.**, Гайнуллина Д.К., Тарасова О.С. Вызванная тироксином быстрая вазодилатация артерии икроножной мышцы крыс опосредуется интегрином  $\alpha\beta_3$ , расположенным в гладкомышечных клетках сосуда // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. — Т. 1. — Типография Пятый Формат Серпухов, 2019. — С. 168–172.
3. Борзых А.А., **Селиванова Е.К.**, Швецова А.А., Кузьмин, И.В., Нестеренко, А.М., Тарасова, О.С. Изменение экспрессии генов-регуляторов кальциевого гомеостаза в миокарде крысы при произвольной физической тренировке: роль тиреоидных гормонов / // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. — Т. 1. — Типография Пятый Формат Серпухов, 2019. — С. 213–218.

### **Тезисы докладов в сборниках материалов конференций**

1. **Селиванова Е.К.**, Гайнуллина Д.К., Тарасова О.С. Расслабление артерий скелетных мышц крысы под действием тироксина связано с подавлением интегриновой сигнализации в гладкомышечных клетках // ФИЗИОЛОГИЯ И ПАТОЛОГИЯ КРОВООБРАЩЕНИЯ. VII Всероссийская с международным участием школа-конференция. Тезисы докладов. — РА ИЛЬФ Москва, 2020. — С. 115–116.
2. **Селиванова Е.К.**, Гайнуллина Д.К., Тарасова О.С. Быстрый вазодилататорный эффект T<sub>4</sub> в артериях скелетных мышц крыс опосредован интегрином  $\alpha\beta_3$  и интегрин-связанной киназой // Третья молодежная школа-конференция Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций. — М.: Наука, 2019. — С. 28–29.
3. **Selivanova E.**, Gaynullina D., Tarasova O. S. Thyroxine direct vasodilating effect in skeletal muscle artery is mediated by integrin  $\alpha\beta_3$  // Europhysiology 2018. — London, 2018. — P. 476–476.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АХ – ацетилхолин  
 ДМСО – диметилсульфоксид  
 Зависимость «К-Э» – зависимость «концентрация-эффект»  
 САД – систолическое артериальное давление  
 ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени  
 eNOS (endothelial NO-synthase) – эндотелиальная синтаза оксида азота  
 ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) – киназы, регулируемые  
 внеклеточными сигналами  
 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) –  
 глицеральдегидфосфатдегидрогеназа  
 ILK (integrin-linked kinase) – интегрин -зависимая киназа  
 iNOS (inducible NO-synthase) – индуцибельная синтаза оксида азота  
 IOP (ioproanoic acid) – иопановая кислота  
 L-NNA (N<sup>o</sup>-Nitro-L-arginine) –N-нитро-L-аргинин  
 L-NAME (N<sup>o</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester) – метиловый эфир N<sup>o</sup>-нитро-L-  
 аргинина  
 MLC2 (myosin light chain) – регуляторные легкие цепи миозина 2  
 MX (methoxamine) – метоксамин  
 nNOS (neuronal NO-synthase) – нейрональная синтаза оксида азота  
 SDS (sodium dodecyl sulfatе) – додецилсульфат натрия

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проводилась при поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований №19-315-90027 («Аспиранты») и №19-015-00482.

Автор выражает искреннюю благодарность Тарасовой Ольге Сергеевне за чуткое руководство, поддержку инициатив и помощь на всех этапах исследования; Гайнуллиной Дине Камилевне за внимательное отношение, помощь в освоении методик и написании статей, Швецовой Анастасии Алексеевне за поддержку и помощь в любой ситуации, Мартыянову Андрею Александровичу, Борзых Анне Анатольевне, Кузьмину Илье Владимировичу, Кирюхиной Оксане Олеговне, Макухе Юлии Андреевне, Лазаренко Варваре Сергеевне, Богоцкому Кириллу Алексеевичу, Печковой Марте Германовне за помощь и поддержку, а также за создание продуктивной атмосферы в лаборатории.

Автор сердечно благодарен Смирновой Ольге Вячеславовне за внимательное прочтение и рецензирование данной работы, высказанные замечания и предложения.

Автор глубоко признателен заведующему кафедрой физиологии человека и животных Каменскому Андрею Александровичу, а также всем сотрудникам кафедры за положительное отношение, интерес к работе и поддержку.

Автор невероятно благодарен родным, близким и друзьям, в особенности Митевой Анне Степановне, Халезову Ивану Александровичу, Перес-Риверо Марку, Костюниной Дарье Сергеевне, Овчаренко Тамаре Александровне, Безменовой Александре Александровне, Гараже Александре Андреевне, Яфраковой Ольге Михайловне, Ландо Андрею Сергеевичу, Филатовой Татьяне Сергеевне, Павловой Надежде Сергеевне, а также Селивановой Ольге Александровне, Яковлевой Елене Пантелеевне и Яковлеву Анатолию Владимировичу за неизменную поддержку на всех этапах работы, веру в результат, участие и понимание.