

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
Биологический ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Селиванова Екатерина Константиновна

**МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ
НА АРТЕРИИ КРЫС**

Специальность – 03.03.01 – Физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
О. С. Тарасова

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Синтез и метаболизм тиреоидных гормонов.....	12
1.2 Механизмы действия тиреоидных гормонов	16
1.3 Геномный механизм действия тиреоидных гормонов	17
1.3.1 Геномное действие тиреоидных гормонов на сосуды.....	19
1.3.2 Тканеспецифичная регуляция интенсивности геномного действия тиреоидных гормонов.....	22
1.4 Регуляция экспрессии дейодиназы 2 типа.....	24
1.4.1 Общие принципы регуляции.....	24
1.4.2 Регуляция тиреоидными гормонами	24
1.4.3 Регуляция адренергическими стимулами.....	26
1.4.4 Регуляция другими стимулами	27
1.4.5 Регуляция экспрессии дейодиназы 2 типа в сосудах.....	28
1.5 Негеномный механизм действия тиреоидных гормонов	30
1.5.1 Негеномное действие тиреоидных гормонов, опосредованное цитоплазматическими белками.....	32
1.5.2 Негеномное действие тиреоидных гормонов, опосредованное мембранными белками	33
1.5.3 Негеномное действие тиреоидных гормонов на сосудистую систему	35
1.5.3.1 Негеномное действие тиреоидных гормонов на ангиогенез.....	36
1.5.3.2 Негеномное действие тиреоидных гормонов на тонус сосудов	36
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	43
2.1 Экспериментальные животные	43
2.2 Объект исследования	43
2.3 Экспериментальные модели.....	44
2.3.1 Модель хронического гипертиреоза.....	44
2.3.2 Модель хронической неонатальной десимпатизации	45
2.3.3 Модель хронического подавления синтеза оксида азота	45
2.3.4 Методики, использовавшиеся для характеристики экспериментальных моделей.....	46
2.3.4.1 Получение сыворотки крови	46
2.3.4.2 Определение концентраций тиреоидных гормонов в сыворотке крови.....	46
2.3.4.3 Определение метаболитов NO в сыворотке крови	47
2.3.4.4 Измерение систолического артериального давления плетизмографическим методом (tail cuff).....	47

2.3.4.5 Визуализация адренергических волокон в стенке артерий.....	48
2.4 Культивирование артерий	48
2.4.1 Условия культивирования	48
2.4.2 Определение оптимального срока культивирования для оценки функциональной роли D2 в сосудах.....	49
2.4.3 Оценка функциональной роли D2 в сосудах	50
2.5 Регистрация сократительной активности артерий в изометрическом режиме	50
2.5.1 Оборудование и подготовка к эксперименту	50
2.5.2 Процедура определения оптимального растяжения сосуда.....	52
2.5.3 Процедура активации препарата и проверка функциональной активности эндотелия	53
2.5.4 Фармакологические агенты, использованные в экспериментах на изолированных сосудах	54
2.5.5 Протокол эксперимента по исследованию влияния 12-часового культивирования на сократительные ответы артерий	58
2.5.6 Протокол эксперимента по исследованию влияния ингибитора 5'-дейодирования на реакции сокращения и расслабления артерий.....	58
2.5.7 Протокол эксперимента по исследованию быстрого расслабления артерий под действием T ₃ и T ₄	59
2.5.8 Протокол эксперимента по исследованию быстрых эффектов T ₃ и T ₄ на сократительные ответы артерий	60
2.5.9 Обработка результатов	61
2.6 Определение уровня мРНК в тканях методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.....	62
2.6.1 Выделение РНК и проведение обратной транскрипции	62
2.6.2 Проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени.....	63
2.6.3 Обработка результатов	65
2.7 Определение уровня белка в тканях методом Вестерн блот	65
2.7.1 Подготовка образцов артерий для определения содержания фосфорилированных форм белков	65
2.7.2 Гомогенизация образцов	66
2.7.3 Разделение белков методом гель-электрофореза и электроперенос	66
2.7.4 Детекция белков на мембранах с помощью антител.....	67
2.7.5 Детекция вторичных антител и обработка результатов	68
2.8 Статистическая обработка результатов	69
3 РЕЗУЛЬТАТЫ	70

3.1 Результаты исследования механизмов регуляции экспрессии дейодиназы 2 типа в артериях <i>in vivo</i>	70
3.1.1 Сравнение характеристик артерий икроножной мышцы и тонкого кишечника	70
3.1.2 Влияние хронического гипертиреоза на экспрессию дейодиназы 2 типа в артериях икроножной мышцы	72
3.1.3 Влияние хронической неонатальной десимпатизации на экспрессию дейодиназы 2 типа в артериях икроножной мышцы и тонкого кишечника.....	76
3.1.4 Влияние хронического подавления синтеза NO на экспрессию дейодиназы 2 типа в артериях икроножной мышцы и тонкого кишечника.....	79
3.2 Результаты исследования функциональной роли дейодиназы 2 типа в артериях икроножной мышцы с использованием методики культивирования	81
3.2.1 Динамика изменений экспрессии дейодиназы 2 типа и TR α при культивировании артерий	82
3.2.2 Влияние культивирования в течение 12 ч на реакции сокращения и расслабления артерий	83
3.2.3 Влияние ингибитора 5'-дейодирования на сократительные ответы и тоническую продукцию оксида азота в артериях.....	85
3.2.4 Влияние ингибитора 5'-дейодирования на вклад оксида азота в эндотелий-зависимое расслабление артерий	88
3.2.5 Влияние ингибитора 5'-дейодирования на экспрессию дейодиназы 2 типа и TR α	90
3.2.6 Влияние ингибитора 5'-дейодирования на экспрессию генов-мишеней геномного действия тиреоидных гормонов	91
3.2.7 Влияние ингибитора 5'-дейодирования на экспрессию генов, регулирующих продукцию оксида азота	93
3.3 Результаты исследования быстрых негеномных эффектов тиреоидных гормонов на артерии икроножной мышцы	94
3.3.1 Сравнение реакций расслабления артерии при негеномном влиянии T ₃ и T ₄	94
3.3.2 Исследование роли эндотелия в расслаблении артерий под действием тиреоидных гормонов.....	97
3.3.3 Влияние блокатора интегрин $\alpha v \beta 3$ на расслабление артерий под действием T ₄	97
3.3.4 Влияние T ₄ на уровень фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина в артериях	98
3.3.5 Влияние блокатора кальций-зависимых калиевых каналов большой проводимости на расслабление артерий под действием T ₄	99

3.3.6 Влияние ингибиторов протеинкиназ ERK1/2 и ILK на расслабление артерий под действием T ₄	100
3.3.7 Влияние ингибиторов Src-киназы и Rho-киназы на расслабление артерий под действием T ₄	101
3.3.8 Влияние T ₄ на уровень фосфорилирования протеинкиназы Akt и субъединицы фосфатазы легких цепей миозина MYPT1 в артериях.....	103
4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	105
4.1 Обобщение полученных результатов.....	105
4.2 Механизмы регуляции экспрессии D2 <i>in vivo</i>	106
4.2.1 Экспрессия D2 при гипертиреозе	106
4.2.2 Экспрессия D2 при хронической неонатальной десимпатизации.....	107
4.2.3 Экспрессия D2 при хроническом подавлении синтеза оксида азота	109
4.2.4 Обобщение результатов о регуляции экспрессии D2 в резистивных артериях крыс <i>in vivo</i>	110
4.3 Функциональная роль D2 в резистивных артериях	111
4.3.1 Влияние культивирования на характеристики артерий	111
4.3.2 Активность D2 необходима для поддержания вазомоторной роли NO в артериях скелетных мышц крысы.....	113
4.3.3 Ингибирование D2 приводит к изменению экспрессии генов в артериях скелетных мышц крысы.....	114
4.4 Негеномное действие тиреоидных гормонов на тонус артерий икроножной мышцы.....	115
4.4.1 T ₃ и T ₄ вызывают быстрое расслабление артерий икроножной мышцы	115
4.4.2 Расслабление артерий под влиянием T ₃ и T ₄ опосредовано разными механизмами	117
4.4.3 Расслабление артерий под действием T ₄ опосредовано интегрином $\alpha v \beta 3$, ERK1/2 и ILK, но не VCa, Akt, Src- и Rho-киназой	119
4.4.4 Вызванное T ₄ расслабление артерий связано с подавлением интегриновой сигнализации в гладкомышечных клетках сосудов	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	123
ВЫВОДЫ.....	125
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	128

ВВЕДЕНИЕ

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; Paquette 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 T₃ 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 T₃, так и T₄ 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 T₃ и T₄ 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 T₄, но не T₃ (Sabatino et al., 2015). Тем не менее, в экспериментах на культуре гладкомышечных клеток коронарных артерий и аорты человека T₃ приводил к снижению мРНК D2 в большей степени, чем T₄ (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_3 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_3 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 бедренную 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_3 вызывает более выраженную вазодилатацию (Park et al., 1997), в других – что эффекты T_3 и T_4 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_3 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_3 на целый сосуд. Необходимо комплексное исследование механизмов быстрой вазодилатации при негеномном действии тиреоидных гормонов с определением функциональной активности T_3 и T_4 , 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 T₃ и T₄;
- 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 T₃ 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 T₃ и T₄ опосредованы разными механизмами: эффект T₃ менее выражен, чем эффект T₄, и является эндотелий-зависимым, тогда как эффект T₄ реализуется на уровне гладкой мышцы. Впервые идентифицированы ключевые участники иницируемого T₄ сигнального каскада: интегрин $\alpha\beta_3$, 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 T₃ в артериях резистивного типа развивают современные представления о геномном действии тиреоидных гормонов на сосуды. Полученные данные обеспечивают понимание механизмов негеномного регуляторного влияния T₃ и T₄ 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 (метиловый эфир N^{ω} -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 $\alpha\beta_3$, 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.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы будут рассмотрены механизмы синтеза тиреоидных гормонов и их метаболизма в тканях, затем – механизмы их геномного влияния, включая функциональную роль и регуляцию экспрессии дейодиназы 2 типа. Последний раздел обзора посвящен механизмам негеномного действия тиреоидных гормонов, в том числе их роли в быстрой регуляции тонуса сосудов.

1.1 Синтез и метаболизм тиреоидных гормонов

Фолликулярные клетки щитовидной железы продуцируют две основных формы тиреоидных гормонов, T_3 и T_4 , на основе аминокислоты L-тирозина. Синтез гормонов и рост железы находятся под контролем гипоталамо-гипофизарной системы. При недостатке тиреоидных гормонов в крови клетки гипоталамуса выделяют тиролиберин, который стимулирует секрецию тиреотропного гормона (ТТГ) из передней доли гипофиза. ТТГ, в свою очередь, стимулирует образование и секрецию тиреоидных гормонов щитовидной железой, оказывая положительное влияние на все этапы синтеза, в том числе на захват I фолликулярными клетками, встраивание I в остатки тирозина и объединение тирозиловых остатков (Mondal et al., 2016; Ortiga-Carvalho et al., 2016).

Основной секретируемой формой гормона является T_4 (Laurberg, 1984; Solter et al., 1989). В крови обе формы гормона транспортируются преимущественно в связанном с белками виде из-за низкой гидрофильности. В связи с этим выделяют четыре фракции тиреоидных гормонов в крови: общий и свободный T_4 , а также общий и свободный T_3 . В свободном виде транспортируется около 0.04% T_4 и 0.4% T_3 (Gaynullina et al., 2018; Ortiga-Carvalho et al., 2016). К белкам, транспортирующим T_3 и T_4 в крови взрослых млекопитающих, относятся тироксинсвязывающий глобулин, транстиретин и альбумин (Janssen, Janssen, 2017).

Ранее считалось, что тиреоидные гормоны попадают в клетки путем простой диффузии за счет своей липофильной природы, однако затем выяснилось, что процесс их транспорта в клетку обладает свойством насыщения, что подразумевает наличие белков-переносчиков (Giammanco et al., 2020). По последним данным, свободный T_4 и T_3 могут попадать в клетки при помощи широкого спектра переносчиков. Среди них выделяют три наиболее важных для транспорта тиреоидных гормонов семейства: монокарбоксилатные переносчики (MCT – monocarboxylate transporters, MCT8 и MCT10), переносчики больших нейтральных аминокислот (LAT – large neutral amino acid transporters, LAT1 и LAT2) и переносчики органических анионов (OATP – organic anion transporters, OATP1C1 et al.) (Bianco et al., 2019; Morimoto et al., 2008; Wittmann et al., 2015).

В ткани тиреоидные гормоны могут подвергаться различным превращениям, необходимым для их активации, инактивации, а также выведения из организма. Основные пути метаболизма T_3 и T_4 включают в себя дейодирование, сульфатирование, глюкуронирование, разрыв дифенилэфирной связи, а также дезаминирование и декарбоксилирование боковой цепи (van der Spek et al., 2017).

Дейодирование. Дейодирование – это процесс удаления атома иода из внешнего или внутреннего кольца тиреоидных гормонов. В случае, если дейодирование T_4 происходит в положении 5 внешнего кольца (5'-дейодирование), он превращается в T_3 . Так как T_3 обладает большим сродством к ядерным рецепторам тиреоидных гормонов TR (Schroeder et al., 2014), данный путь считают способом активации тиреоидных гормонов (Gereben et al., 2008). В случае дейодирования внутреннего кольца (5-дейодирование) T_3 или T_4 превращаются в неспособные связываться с TR реверсивный T_3 (r T_3) и дийодтиронин T_2 , поэтому такое дейодирование является инактивирующим (Рис.1) (van der Spek et al., 2017).

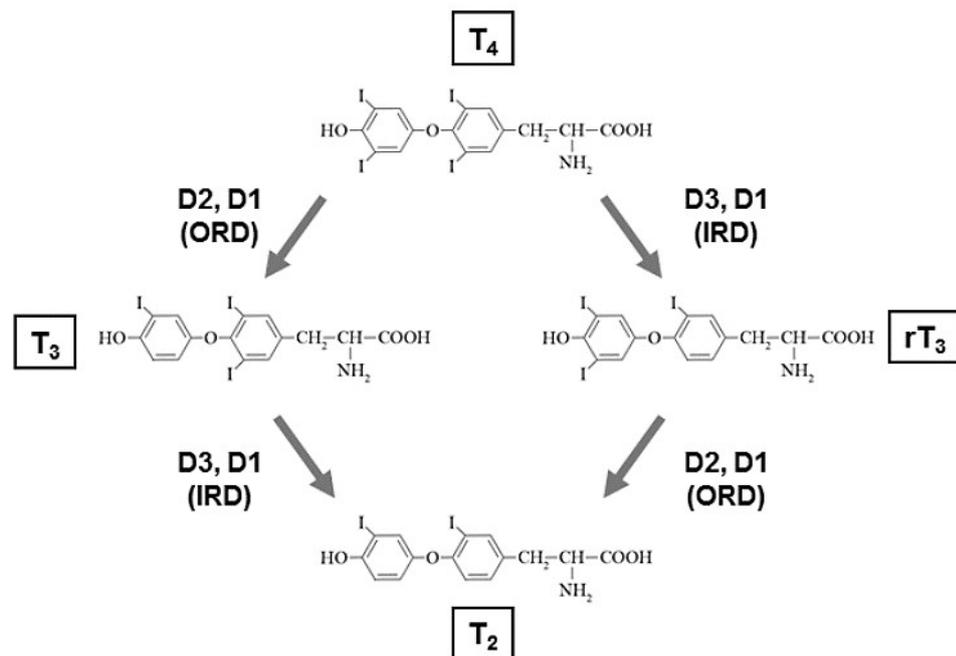


Рис.1. Дейодирование тиреоидных гормонов. ORD – дейодирование внешнего кольца, IRD – дейодирование внутреннего кольца. Рисунок взят из работы (van der Spek et al., 2017).

Катализ реакций дейодирования осуществляют ферменты-дейодиназы. На данный момент клонировано три вида дейодиназ: дейодиназы 1, 2 и 3 типов (D1, D2 и D3, соответственно). Они обладают схожей структурой, относятся к трансмембранным димерным белкам и содержат селеноцистеин в каталитическом центре, то есть являются селенопротеинами (Gereben et al., 2008). Дейодирование – это окислительно-восстановительная

реакция, поэтому лимитирующим фактором для полноценной работы дейодиназ может быть наличие тиолового кофактора, восстанавливающего селеногидрильные группы (Germain, 1988). Несмотря на схожесть структуры изоформ дейодиназ, их биологические функции, экспрессия и даже локализация внутри клетки сильно отличаются (табл.1).

D1 способна катализировать дейодирование как внешнего, так и внутреннего кольца (Рис.1), то есть как активировать, так и инактивировать тиреоидные гормоны. Интересно, что наиболее предпочтительным субстратом для D1 является rT_3 , затем сульфатированный T_4 (T_4S) и T_3 (T_3S), и только после них – T_4 и T_3 (Moreno et al., 1994; Ortiga-Carvalho et al., 2016; Visser et al., 1988). По-видимому, основная роль D1 – это именно инактивация тиреоидных гормонов, в том числе их сульфатированных форм, для последующего выведения из организма (Moreno et al., 1994). Это подтверждается исследованиями на нокаутных по гену D1 мышах: у таких животных увеличен уровень rT_3 в крови, а также снижено содержание иода в моче при повышенной концентрации йодотиронинов в кале по сравнению с диким типом (Schneider et al., 2006). D1 локализована во внешней мембране клетки (Baqui et al., 2000). Экспрессия мРНК D1 положительно регулируется тиреоидными гормонами, так как в промоторе гена D1 есть два тиреоид-чувствительных элемента, с которыми связываются комплексы TR с T_3 , стимулируя транскрипцию (Toyoda et al., 1995). Наиболее высокая экспрессия и активность D1 у крыс, мышей и человека обнаружена в тканях щитовидной железы, печени, почек и гипофиза (Bates et al., 1999; Bianco et al., 2002; Kohrle et al., 1990; Wagner et al., 2003; Wang et al., 2006).

D2 катализирует только реакцию дейодирования внешнего кольца (Рис.1), то есть обеспечивает активацию тиреоидных гормонов. Наиболее предпочтительным субстратом D2 является T_4 , тогда как ее аффинность к rT_3 значительно ниже (Ortiga-Carvalho et al., 2016). Константа Михаэлиса-Ментен для T_4 на несколько порядков ниже у D2 по сравнению с D1, то есть активация T_4 происходит в первую очередь за счет активности D2 (Bianco et al., 2002). D2 располагается в мембране эндоплазматического ретикулума (ЭПР) (Baqui et al., 2000). D2 подвержена негативной регуляции со стороны тиреоидных гормонов, которые уменьшают содержание мРНК и активность фермента (Bianco et al., 2002; Croteau et al., 1996). Экспрессия и активность D2 обнаружены во многих тканях человека и крысы, в том числе в головном мозге, бурой жировой ткани, сердце, скелетных мышцах, гонадах, плаценте (Bates et al., 1999; Bianco, Kim, 2006; Croteau et al., 1996).

D3 осуществляет только инактивацию тиреоидных гормонов, катализируя реакцию дейодирования внутреннего кольца (Рис.1). Аффинность D3 к T_4 выше, чем к T_3 (Ortiga-Carvalho et al., 2016). В отличие от D1, как D3, так и D2 не катализируют дейодирование сульфатированных форм гормонов (Gereben et al., 2008), то есть не играют значимой роли в выведении йодотиронинов. D3 является основной дейодиназой, инактивирующей T_4 и T_3 , так как

D1 обладает значительно более высокой K_m по отношению к этим субстратам. D3 локализована в наружной мембране клеток. Экспрессия гена D3 положительно регулируется тиреоидными гормонами (Barca-Mayo et al., 2011). Экспрессия и активность D3 сильно изменяется в онтогенезе: она обнаруживается почти во всех тканях плода крыс, тогда как во взрослом организме спектр ее экспрессии более узок. Наиболее высокая активность D3 у взрослых крыс обнаружена в коже, мозге и плаценте (Bates et al., 1999; Bianco et al., 2002). Считается, что высокая активность D3 в плаценте связана с необходимостью защитить плод от высокой концентрации тиреоидных гормонов в крови матери (Mortimer et al., 1996).

Таблица 1. Характеристика различных типов дейодиназ млекопитающих.

Свойства	D1	D2	D3
Дейодирование	Внешнее и внутреннее кольцо	Внешнее кольцо	Внутреннее кольцо
Аффинность к субстратам	$rT_3 > T_4S > T_3S > T_4 > T_3$	$T_4 > rT_3$	$T_3 > T_4$
Внутриклеточная локализация	Наружная мембрана	Мембрана ЭПР	Наружная мембрана
Распространенность в организме (основные ткани)	Щитовидная железа, печень, почки, гипофиз	Мозг, бурый жир, сердце, скелетные мышцы, гонады, плацента	Взрослые животные: кожа, мозг, плацента Плод: практически все ткани
Влияние тиреоидных гормонов на экспрессию мРНК	Стимуляция	Подавление	Стимуляция

На основе (Bates et al., 1999; Ortiga-Carvalho et al., 2016).

Сульфатирование и глюкуронирование. Еще один важный путь метаболизма тиреоидных гормонов – конъюгация гидроксильной группы (положение 4'-ОН) с глюкуроновой или серной кислотами. В случае присоединения сульфата (сульфатирования) реакцию катализируют ферменты сульфотрансферазы. Сульфатирование T_4 и T_3 увеличивает скорость их дейодирования посредством D1 (Moreno et al., 1994; van der Spek et al., 2017). D1 способна к дейодированию и внешнего, и внутреннего кольца T_4 , но присоединение сульфата блокирует дейодирование внешнего кольца, в результате чего происходит инактивация гормона с образованием сульфатированного rT_3 . Кроме того, сульфатирование увеличивает

растворимость тиреоидных гормонов, ускоряя выведение йодтиронинов с мочой и желчью. T₄S и T₃S биологически не активны (van der Spek et al., 2017).

Конъюгацию с глюкуроновой кислотой катализируют глюкуронозилтрансферазы, локализованные в печени, почках и кишечнике. Глюкуронированию преимущественно подвергается T₄, а не T₃. Глюкуронирование также увеличивает растворимость гормонов, что усиливает их выведение в кишечник вместе с желчью. Глюкуронирование обратимо, и в кишечнике может произойти деконъюгация под действием β-глюкуронидазы микробиоты. В этом случае высвободившийся гормон может попасть в кровь и вернуться в печень, завершив энтерогепатический цикл (Herder de et al., 1989). Таким образом, глюкуронирование является одновременно способом и выведения йодтиронинов, и создания их резервуара в кишечнике (van der Spek et al., 2017).

Дезаминирование и декарбоксилирование боковой цепи. К менее распространенным путям метаболизма тиреоидных гормонов относятся типичные для обмена аминокислот пути окислительного дезаминирования или декарбоксилирования боковой цепи, в случае тиреоидных гормонов – аланина. В результате декарбоксилирования T₄ образуется тетраiodотиронамин, который затем подвергается дейодированию с образованием различных тиронаминов. Дезаминирование T₄ и T₃ приводит к образованию тетрака (тетраiodотироуксусной кислоты) и триака (триiodотироуксусной кислоты), соответственно (van der Spek et al., 2017). Тетрак используется в качестве блокатора, предотвращающего стимуляцию ангиогенеза тиреоидными гормонами (Bergh et al., 2005).

Разрыв дифенилэфирной связи. К наименее распространенным путям метаболизма тиреоидных гормонов (меньше 5% метаболизируемых молекул) относится разрыв дифенилэфирной связи. В этом случае происходит разрушение эфирного мостика между двумя кольцами в составе тиронинов. Основным продуктом этой реакции является дийодотиронин. Разрыв дифенилэфирной связи катализируется пероксидазами (van der Spek et al., 2017).

1.2 Механизмы действия тиреоидных гормонов

После попадания в ткань тиреоидные гормоны действуют по двум механизмам: геномному и негеномному. При классическом геномном действии тиреоидные гормоны входят в ядро, где связываются с ядерными рецепторами TR, выступающими в роли лиганд-зависимых транскрипционных факторов, изменяющих экспрессию генов-мишеней, содержащих TRE (Bernal, 2017; Raquette et al., 2011; Vella, Hollenberg, 2017). Геномное действие тиреоидных гормонов связано с транскрипцией, поэтому геномные эффекты наблюдаются через час и более после взаимодействия гормона с рецептором, а сами эффекты считаются долговременными (Cheng et al., 2010; Flamant, Samarut, 2003; Mullur et al., 2014). Традиционно большую часть

эффектов тиреоидных гормонов на организм связывают именно с этим механизмом действия (Das et al., 2010).

Негеномное действие тиреоидных гормонов открыли позже, когда обнаружили, что некоторые эффекты тиреоидных гормонов на митохондрии не зависят от синтеза белка и наблюдаются уже через несколько минут после введения T_3 крысам (Sterling et al., 1980). В связи с этим изначально негеномный механизм действия определили как быстрый (развивающийся в течение нескольких секунд или минут) и не зависящий от транскрипции генов и синтеза белка (Axelband et al., 2010). Впоследствии оказалось, что это определение не соответствует действительности, так как в результате негеномного действия также может происходить модуляция транскрипции генов (Davis et al., 2009). Сейчас к негеномным относят все эффекты, которые инициируются гормоном вне ядра, то есть опосредуемые рецепторами, локализованными в плазматической мембране, цитоплазме или других органеллах клетки (например, митохондриях) (Davis et al., 2018; Louzada, Carvalho, 2018).

1.3 Геномный механизм действия тиреоидных гормонов

Геномное действие тиреоидных гормонов реализуется благодаря связыванию T_3 или, в меньшей степени из-за сравнительно низкой аффинности, T_4 с TR в ядре (Samuels et al., 1974; Schroeder et al., 2014).

Рецепторы тиреоидных гормонов TR относятся к суперсемейству ядерных рецепторов, также включающему рецепторы стероидных гормонов, ретиноевой кислоты, витамина D и жирных кислот (Mangelsdorf et al., 1995). Структура ядерных рецепторов включает три основных домена: NH_2 -домен (A-B домен), ДНК-связывающий домен, содержащий два мотива «цинковые пальцы» и распознающий TRE, и лиганд-связывающий домен на $COOH$ -конце. Лиганд-связывающий домен также отвечает за гомо- и гетеродимеризацию TR с другими ядерными рецепторами, например, ретиноидными X-рецепторами RXR (Ortiga-Carvalho et al., 2016). Гетеродимеризация TR с RXR приводит к увеличению числа T_3 -чувствительных генов в клетке по сравнению с гомодимеризацией (Diallo et al., 2007). Влияние тиреоидных гормонов на экспрессию генов является двухступенчатым, так как их рецепторы способны модулировать транскрипцию и в несвязанном с T_3 состоянии. Например, в отсутствие лиганда TR могут садиться на TRE и рекрутировать корепрессоры, подавляя транскрипцию гена-мишени. В случае связывания с T_3 конформация TR изменяется, и комплекс гормон-рецептор рекрутирует активаторы, усиливающие транскрипцию (Anyetei-Anum et al., 2018; Ishizuka, Lazar, 2005). Кроме того, комплексы TR с T_3 могут влиять на транскрипцию генов, не содержащих TRE, путем образования комплексов с другими транскрипционными факторами, например, рецепторами эстрогенов, в ядре (Vasudevan et al., 2002).

У млекопитающих ядерные рецепторы тиреоидных гормонов кодируются двумя генами *Thra* и *Thrb*, расположенными в разных хромосомах: для человека это 17 и 3, соответственно (Cheng et al., 2010). Оба локуса являются сложными и кодируют множество изоформ рецепторов за счет альтернативных промоторов и альтернативного сплайсинга (Flamant, Samarut, 2003). Среди изоформ TR есть как полностью функциональные, так и укороченные рецепторы, не имеющие ДНК- и/или лиганд-связывающего доменов (Chassande et al., 1997). Считается, что укороченные формы рецепторов выполняют функцию антагонистов транскрипционных эффектов тиреоидных гормонов, так как они могут конкурировать с функциональными рецепторами за гормон или TRE (Flamant, Samarut, 2003; Plateroti et al., 2001; Wills et al., 1991). Помимо этого, укороченные изоформы могут опосредовать негеномное действие тиреоидных гормонов (см. главу 1.5.1) (Davis et al., 2008).

Ген *Thra* кодирует три полноразмерные изоформы TR α (TR α 1, TR α 2, TR α 3), а также несколько укороченных изоформ. Только изоформа TR α 1 является *bona fide* ядерным рецептором, способным связывать и T₃, и TRE (Anyetei-Anum et al., 2018). мРНК TR α 1 обнаружена во многих тканях, причем в тканях крыс экспрессия этого рецептора наблюдается на самых ранних этапах онтогенеза, на 11 день эмбрионального развития, еще до созревания щитовидной железы (Bradley et al., 1992; Chassande et al., 1997). Наиболее высокий уровень экспрессии TR α 1 у взрослых грызунов был обнаружен в сердечной и скелетной мышцах, центральной нервной системе, а также в кишечнике и легких. Изоформы TR α 2 и TR α 3 не способны связывать гормон, в связи с этим они могут играть роль антагонистов тиреоидных эффектов, конкурируя с функциональной формой TR α 1 за связывание с TRE. Высокая экспрессия TR α 2 и TR α 3 наблюдалась в мозге, сердце, почках (Anyetei-Anum et al., 2018; Chassande et al., 1997; Hodin et al., 1990; Mitsuhashi et al., 1988).

Ген *Thrb* кодирует четыре полноразмерные изоформы TR β (TR β 1, TR β 2, TR β 3, TR β 4), а также несколько укороченных форм. Все полноразмерные изоформы TR β содержат функциональный лиганд-связывающий домен. Экспрессия TR β 1 обнаружена во многих тканях, в том числе в печени, почках, сердце, мозге и щитовидной железе (Cheng, 2000; Hodin et al., 1990). Высокое содержание мРНК TR β 2 обнаружено в гипофизе, сетчатке глаза, мозге, внутреннем ухе, TR β 3 - в сердце, печени, почках и легких, а TR β 4 – в мозге и почках (Anyetei-Anum et al., 2018; Bradley et al., 1992; Hodin et al., 1990; Jones et al., 2007; Williams, 2000).

Нужно отметить, что экспрессия считающихся наиболее функционально важными изоформами TR α 1 и TR β 1 имеет разный пространственно-временной характер: органы и ткани экспрессируют эти изоформы в разные периоды онтогенеза, и области с высоким уровнем мРНК TR α 1 или TR β 1 преимущественно не совпадают (Bradley et al., 1992; Stoykov et al., 2006). Интересно, что TR α 1 и TR β 1 могут по-разному модулировать транскрипцию. Например, TR β 1

чаще образует гомодимеры, чем TR α 1 (Hollenberg et al., 1995; Ortiga-Carvalho et al., 2016). В дополнение к этому, известно, что в печени грызунов TR α 1 и TR β 1 регулируют экспрессию разных генов-мишеней (Gullberg et al., 2002).

1.3.1 Геномное действие тиреоидных гормонов на сосуды

Основной изоформой TR в сосудах является TR α 1. Его экспрессия была обнаружена и в эндотелии, и в гладкомышечных клетках сосудов (Hiroi et al., 2006; Makino et al., 2012). В сосудах также была детектирована мРНК и других изоформ ядерных рецепторов, но в гораздо меньшей степени. В частности, в эндотелиальных клетках бычьей аорты и пупочной вены человека также была обнаружена мРНК TR α 2. Кроме того, в эндотелии данных сосудов были выявлены следовые количества мРНК и белка TR β 1 (Hiroi et al., 2006). По оценке группы (Diekman et al., 2001), в линии ECRF4 иммортализованных эндотелиальных клеток пупочной вены человека содержится около 50 копий мРНК TR α 1, пяти копий TR α 2 и двух копий TR β 1 на клетку. Им также удалось качественно детектировать все три изоформы ядерных рецепторов на уровне белка.

В гладкомышечных клетках коронарных сосудов и аорты человека помимо TR α 1 также наблюдалась экспрессия мРНК TR α 2, и на существенно более низком уровне – TR β 1 и TR β 2 (Mizuma et al., 2001). Таким образом, геномное действие тиреоидных гормонов на сосуды опосредует преимущественно TR α 1.

Несмотря на выраженные изменения тонуса сосудов, сопровождающие гипо- и гипертиреоз как у людей (Klein, 1990), так и у животных (Bausch, McAllister, 2003; McAllister et al., 1998; Vargas et al., 2006), геномное действие тиреоидных гормонов именно на сосуды изучено мало.

Нокаут гена *Thra* (TR α ^{0/0}) приводил к ослаблению сократительных ответов верхних брыжеечных артерий мышей на агонист α ₁-адренорецепторов фенилэфрин, уменьшению эндотелий-зависимого расслабления и снижению чувствительности гладкой мышцы к донору оксида азота (Liu, Lo, et al., 2014). Нужно отметить, что аналогичные изменения адренореактивности и эндотелий-зависимой вазодилатации были обнаружены во многих работах при моделировании экспериментального гипотиреоза у крыс (Delp et al., 1995; Grieve et al., 1999; Rahmani et al., 1987; Sabio et al., 1994; Singh et al., 1994; Vargas et al., 2006).

Исследования на мышах с изоформ-специфичным нокаутом TR α 1^{-/-} (Wikström et al., 1998) также показали ключевую роль TR α 1 в регуляции вазомоторных реакций коронарных артерий (Makino et al., 2012). Тем не менее, в этом случае наблюдалось увеличение сократительных ответов артерий при нерепепторной активации высокими концентрациями KCl, а сократительные реакции на агонисты и эндотелий-зависимое расслабление препаратов не

были исследованы. Авторы связали увеличение сократительных ответов со снижением калиевого тока в гладкомышечных клетках коронарных артерий животных, что также подтверждалось более низким уровнем экспрессии субъединиц нескольких подтипов калиевых каналов (Makino et al., 2012).

Специфическая мутация TR α 1, значительно уменьшающая его аффинность к T₃, приводила к снижению реактивности хвостовых артерий мышей на агонист α ₁-адренорецепторов фенилэфрин, что согласуется с результатами группы K. Liu (Liu et al., 2014). Вместе с тем эндотелий-зависимое расслабление на ацетилхолин в артериях таких мышей было парадоксально увеличено (Warner et al., 2013).

Стоит отметить, что данные об изменении вазомоторных реакций артерий мышей с нокаутом или мутацией TR α 1 не позволяют однозначно выявить геномные эффекты тиреоидных гормонов на сосуды. Из-за сложного строения локуса при делеции гена *Thra* целиком, или при нарушении синтеза изоформы TR α 1, во-первых, нарушается синтез и укороченных изоформ рецепторов, которые могут играть роль антагонистов тиреоидных гормонов или опосредовать их негеномные эффекты (Davis et al., 2018; Flamant, Samarut, 2003; Plateroti et al., 2001). Во-вторых, TR α 1 также может транспортироваться в цитоплазму и участвовать в негеномных эффектах тиреоидных гормонов (подробнее см. в главе 1.5.1) (Hiroi et al., 2006), то есть фенотип мышей без TR α 1 является следствием недостатка как геномного, так и негеномного действия тиреоидных гормонов. Более низкая аффинность мутантного рецептора TR α 1 также может привести к ослаблению не только геномного, но и негеномного действия T₃. Интерпретация экспериментов на генетически модифицированных мышах также зависит от линии мышей, используемой в качестве основы. Было показано, что нокаут гена *Thra* у мышей линии SV129 сопровождается значимым повышением систолического и диастолического артериального давления, тогда как нокаут того же гена в линии C57BL/6 не влияет на параметры гемодинамики (Liu et al., 2014).

Для исследования геномного действия тиреоидных гормонов на сосуды также оценивают изменение экспрессии различных генов в ответ на введение T₃ или T₄, однако нужно учесть, что и при такой постановке эксперимента нельзя однозначно исключить вклад негеномного действия гормонов, которое также способно влиять на транскрипцию (Moeller et al., 2006; Moeller et al., 2005).

Исследование на мышах с использованием ДНК-микрочипов показало, что четырехдневное потребление T₄ приводит к изменению экспрессии 777 из 1098 генов в аорте более чем в 1.25 раз, при этом экспрессия 495 генов была повышена, а 282 – понижена (Gachkar et al., 2019). Наиболее измененными оказались гены с функцией «связывания белка» или «связывания ионов», что указывает на выраженные изменения внутриклеточных сигнальных

каскадов. В числе наиболее чувствительных к тиреоидным генам, значимое изменение экспрессии которых подтвердила полимеразная цепная реакция (ПЦР-РВ), оказались гены *Penk* (уменьшение уровня мРНК, белок проэнкефалин), *Fbln1* (уменьшение уровня мРНК, белок фибулин 1) и *Hr* (увеличение уровня мРНК, белок hairless) (Gachkar et al., 2019). Роль этих генов в геномном действии тиреоидных гормонов на сосуды пока не исследована, однако гипотетически связывание проэнкефалина с опиоидными рецепторами, изменение состава внеклеточного матрикса при снижении содержания фибулина 1 или модуляция транскрипции генов-мишеней hairless может отражаться на сократительных реакциях артерий.

В экспериментах на клеточных культурах эндотелиальных или гладкомышечных клеток артерий было обнаружено стимулирующее влияние тиреоидных гормонов на экспрессию NADPH-оксидазы NOX-1, ядерного антигена пролиферирующих клеток PCNA, α -актина, эктонуклеотидазы CD73, молекулы межклеточной адгезии ICAM-1, эндотелина-1, фибронектина и фактора фон Виллебранда (Baumgartner-Parzer et al., 1997; Dietrich et al., 1997; Tamajusuku et al., 2006; Wang, Sun, 2010).

Большая часть исследователей сосредоточила свои усилия на изучении геномного действия тиреоидных гормонов на сердце (Axelband et al., 2010; Li et al., 2014), развитие (Chattergoon et al., 2012; Mai et al., 2004), а также сократимость которого регулируется тиреоидными влияниями (Katzeff et al., 1997; Klein, 1990). Тем не менее, некоторые Т₃-зависимые гены кардиомиоцитов также экспрессируются и в тканях сосудов, что позволяет предположить аналогичное влияние тиреоидных гормонов на клетки артерий. К числу таких генов относят кодирующие кальциевый насос ЭПР *Serca2* (Борзых и др., 2020; Hartong et al., 1994), фосфоламбан (Arai et al., 1991), рианодинорный рецептор 2 типа *RyR2* (Arai et al., 1991; Campanha et al., 2016), калиевый потенциал-зависимый канал *Kv1.5* (Li et al., 2014), Na^+/K^+ АТФазу (Kamitani et al., 1992), β 1-адренорецептор (Li et al., 2014), аденилатциклазу 5 типа (Li et al., 2014), кавеолин-1 (Ratajczak, 2005), эндотелиальную синтазу оксида азота eNOS (Castro de et al., 2015).

В сосудах также экспрессируются некоторые тиреоид-чувствительные гены, чья зависимость от Т₃ или Т₄ была исследована в экспериментах на других тканях. Среди них функциональное значение для артерий могут иметь гены, кодирующие нейрональную и индуцибельную NO-синтазу (Fernández et al., 2009; Serfz et al., 2009).

Нужно отметить, что несмотря на то, что стимулирующее влияние тиреоидных гормонов на экспрессию синтаз оксида азота и его продукцию широко известно, в промоторе генов nNOS, iNOS и eNOS, насколько нам известно, не были идентифицированы TRE. Кроме того, все больше данных свидетельствует о негеномной регуляции экспрессии и активности этих

ферментов, по крайней мере, в сосудах (Carrillo-Sepulveda et al., 2010; Hiroi et al., 2006; Samuel et al., 2017; Toral et al., 2018) (см. главу 1.5.3.2).

Таким образом, на данный момент некоторые аспекты геномного действия тиреоидных гормонов на сосуды остаются мало изученными, но его значимость для адекватного функционирования артерий не подлежит сомнению. Геномные эффекты тиреоидных гормонов, опосредованные ядерными рецепторами, влияют на сократительные ответы и расслабление артерий. В связи с этим, регуляция интенсивности геномного действия тиреоидных гормонов на сосуды также может быть важна для «тонкой настройки» работы сосудов.

1.3.2 Тканеспецифичная регуляция интенсивности геномного действия тиреоидных гормонов

Геномное действие тиреоидных гормонов модулирует экспрессию широкого спектра генов-мишеней во многих тканях, причем их влияние на транскриптом наиболее выражено в центральной нервной системе и печени (Ochsner, McKenna, 2020). Однако единый уровень свободного T_3 в плазме крови не может обеспечить тканеспецифичную регуляцию интенсивности действия гормонов, необходимую для тонкой регуляции работы клеток. По всей видимости, тканеспецифичность интенсивности геномного действия T_3 регулируется на локальном уровне. К факторам, влияющим на выраженность геномных влияний тиреоидных гормонов на локальном уровне, относятся уровень экспрессии трансмембранных транспортеров и разных изоформ дейодиназ, содержание и соотношение изоформ ядерных рецепторов, а также локализация ядерных рецепторов в клетке (Anyetei-Anum et al., 2018; Bianco et al., 2019; Zhu et al., 1998). Теория локальной регуляции геномного действия тиреоидных гормонов имеет экспериментальные подтверждения. В частности, в ее пользу свидетельствуют данные РНК-секвенирования единичных клеток (single-cell RNA-seq) о тканеспецифичности паттернов экспрессии транспортеров, дейодиназ, $TR\alpha$ и $TR\beta$. Например, в гепатоцитах и нейронах мышей обнаружена значимая тенденция к коэкспрессии транспортера MCT10 с рецепторами $TR\alpha$ и $TR\beta$, что согласуется с выраженным транскриптомным следом тиреоидных гормонов в печени и мозге (Hu, Wu, 2021; Ochsner, McKenna, 2020). Интересно, что аналогичная зависимость была обнаружена в эндотелиальных клетках, что может отражать значимость геномных влияний тиреоидных гормонов на сосуды (Hu, Wu, 2021).

Дополнительным свидетельством локальной регуляции тиреоидного действия является отличие тканевой концентрации тиреоидных гормонов от концентрации в крови. Например, у крыс при уровне свободного T_3 в сыворотке 4.54 ± 0.16 пМ его концентрация в почках составляла 19.7 ± 1.26 пМ/г, в печени – 12.9 ± 0.81 пМ/г, а в висцеральной белой жировой ткани – 0.2 ± 0.02 пМ/г, то есть разброс концентраций составил почти два порядка (Donzelli et al., 2016).

Разброс концентраций T₄ также был велик – концентрация гормона в печени оказалась в 55 раз больше минимальной концентрации, наблюдавшейся в висцеральной белой жировой ткани (Donzelli et al., 2016). Доля занятых TR в тканях крыс также варьирует: насыщение рецепторов в гипофизе составляет около 80%, тогда как в почках и печени – около 50% (Larsen et al., 1981).

Тканеспецифичность интенсивности геномного действия также была продемонстрирована на трансгенных мышах, в геном которых был вставлен ген люциферазы под контролем промотора, содержащего TRE. Введение мышам T₄ приводило к тканеспецифичному изменению активности люциферазы: в ткани семенников она изменялась в 0.8 раз, в мозге – в 1.5-2 раза, а в бурой жировой ткани – в 64 раза (Mohácsik et al., 2018).

Нужно отметить, что сравнительный вклад перечисленных выше факторов в тканеспецифичную регуляцию интенсивности геномного действия неодинаков. В частности, для геномных влияний тиреоидных гормонов необходимо наличие трансмембранных транспортеров в клетке, однако при их экспрессии выше минимального критического уровня они обеспечивают только более быстрое установление равновесия между концентрацией T₃ и T₄ в крови и внутри клетки, но не влияют на итоговую концентрацию гормонов в клетке (Mulleman van et al., 2016). В большинстве случаев, когда трансмембранные транспортеры определяют выраженность эффектов тиреоидных гормонов, это связано с их инактивацией или выраженным снижением экспрессии (Bianco et al., 2019).

По всей видимости, для тканей с высоким уровнем D2 именно активность дейодиназы вносит наибольший вклад в определение интенсивности геномного действия тиреоидных гормонов, обеспечивая прирост внутриклеточного T₃. У мышей с нокаутом гена D2 наблюдается снижение концентрации T₃ примерно на 50% в некоторых отделах мозга при отсутствии изменения содержания T₃ в крови (Galton et al., 2007). Более того, высокая экспрессия и активность D2 в буром жире обеспечивает увеличение доли занятых TR с 60 до более 95% у крыс, адаптированных к холоду (Bianco, Silva, 1987a; Bianco, Silva, 1987b; Bianco, Silva, 1988; Jones et al., 1986; Silva, Larsen, 1985). Взаимосвязь активности D2 и интенсивности геномного действия тиреоидных гормонов в буром жире подтверждается и экспериментами на трансгенных мышах с люциферазным репортером под промотором, содержащим TRE (Mohácsik et al., 2018).

Особенная физиологическая значимость D2 для реализации геномного действия тиреоидных гормонов может быть связана с ее внутриклеточной локализацией в ЭПР в непосредственной близости от ядра (Vaqui et al., 2000). Вероятно, благодаря этому T₃, образованный под влиянием D2, остается в клетке в течение нескольких часов, тогда как T₃, продуцированный D1, покидает клетку в течение 30 минут (Gereben et al., 2008; Larsen et al., 1981).

В связи с вышесказанным, для клеток, содержащих D2, уровень ее экспрессии может быть одним из важных факторов, определяющих интенсивность геномного действия тиреоидных гормонов.

1.4 Регуляция экспрессии дейодиназы 2 типа

1.4.1 Общие принципы регуляции

Регуляция экспрессии дейодиназы 2 типа может осуществляться как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровне (Gereben, Salvatore, 2005; Gereben et al., 2008). При регуляции на транскрипционном уровне наблюдается изменение мРНК D2. Изменения мРНК D2 может быть достаточно для изменения активности дейодиназы, как это было впервые обнаружено при стимуляции бурой жировой ткани агонистами адренорецепторов (Jones et al., 1986; Silva, Larsen, 1983).

Регуляция на посттранскрипционном уровне осуществляется за счет изменения скорости деградации белка путем его убиквитинирования и деубиквитинирования. Процесс убиквитинирования и последующей протеасомной деградации D2 определяет ее относительно короткое время полужизни – около 40 минут (Gereben et al., 2000). Короткое время полужизни D2 имеет физиологическую значимость, так как благодаря ему возможно быстрое изменение уровня внутриклеточной концентрации T₃ и насыщения TR.

В соответствии с этим, активность D2 может быть интегральным показателем экспрессии D2, и в следующих разделах мы будем учитывать работы, в которых оценивали как уровень мРНК и белка D2, так и ее активность. Нужно отметить, что 5'-дейодиназную активность D2 можно отличить от активности D1 по кинетическим ферментативным параметрам (например, константе Михаэлиса) и по отсутствию чувствительности к тиреостатику пропилтиоурацилу (Croteau et al., 1996; Mizuma et al., 2001).

1.4.2 Регуляция тиреоидными гормонами

К наиболее значимым регуляторам экспрессии D2 можно отнести тиреоидные гормоны. Они осуществляют регуляцию D2 и на транскрипционном, и на посттранскрипционном уровнях (Burmeister et al., 1997; Croteau et al., 1996).

Зависимость экспрессии D2 от тиреоидного статуса была замечена уже в первых экспериментах по клонированию данного фермента. Потребление тиреостатика метимазола (ингибитор ключевого фермента синтеза тиреоидных гормонов – тиреопероксидазы) приводило к значительному увеличению содержания мРНК D2 в гипофизе, бурой и белой жировой ткани, коре больших полушарий крыс (Burmeister et al., 1997; Calvo, Obregon, 2011; Croteau et al.,

1996). Кроме того, был обнаружен прирост активности D2 в большом количестве тканей: мозжечке, коре больших полушарий, гипофизе и буром жире (Croteau et al., 1996). Нужно отметить, что увеличение мРНК D2 в ткани не всегда сопровождалось увеличением ее активности (Burmeister et al., 1997). Гипотиреоз у мышей также приводил к росту содержания мРНК D2 в мозге, сердце и семенниках; эти изменения сопровождались увеличением или тенденцией к увеличению активности фермента (Wagner et al., 2003).

Так как при гипотиреозе наблюдается компенсаторное увеличение мРНК и активности D2 во многих тканях, закономерно ожидать противоположные изменения при гипертиреозе. Действительно, введение T₃ приводило к 70% снижению мРНК D2 в гипофизе и гипоталамусе крыс (Croteau et al., 1996; Kim et al., 1998), но сопровождалось парадоксальным увеличением активности фермента в буром жире и коре больших полушарий (Croteau et al., 1996). Нужно отметить, что прирост активности D2 при гипертиреозе был значительно меньше, чем при гипотиреозе, и может быть следствием малой выборки в данных экспериментах.

В других работах на крысах также было показано значительное снижение мРНК и активности D2 в коре больших полушарий в ответ на введение T₃ (Burmeister et al., 1997). Аналогичное уменьшение мРНК D2 было обнаружено в экспериментах *in vitro* на культурах клеток скелетных мышц человека и опухолевых клеток гипофиза крысы (Hosoi et al., 1999; Kim et al., 1998). У мышей введение T₃ приводило к снижению мРНК D2 в буром жире и сердце, но не в семенниках и коре больших полушарий. Отсутствие эффекта T₃ на кору больших полушарий может быть связано с высоким насыщением TR в этой области, так как при введении T₃ мышам с гипотиреозом мРНК D2 увеличивалось (Wagner et al., 2003). Интересно, что падение мРНК D2 не зависело от синтеза белка, что предполагает прямое негативное влияние T₃ на транскрипцию этого фермента, например, за счет так называемого негативного TRE в промоторе (Kim et al., 1998). Негативное действие T₃ на экспрессию D2 также подтверждалось значимой отрицательной связью между уровнем мРНК D2 и концентрацией свободного T₃ в крови (Burmeister et al., 1997). Аналогичная зависимость была обнаружена в сердце крыс (Борзых и др., 2020).

Эффект T₄ на экспрессию мРНК и активность D2 отличался от эффекта T₃. При введении T₄ крысам наблюдалось значимое снижение активности, но не мРНК D2 в коре больших полушарий (Burmeister et al., 1997). В экспериментах на культуре клеток скелетных мышц человека T₄ уменьшал содержание мРНК D2, но в меньшей степени, чем T₃. При этом его негативный эффект на активность D2 был выражен сильнее, чем у T₃ (Hosoi et al., 1999). Это свидетельствует о том, что T₃ преимущественно осуществляет регуляцию экспрессии D2 на транскрипционном, а T₄ – на посттранскрипционном уровне. Этот вывод подтверждается отсутствием негативного эффекта T₄ на активность D2 при добавлении ингибитора синтеза

белка или ингибитора протеасом к культуре клеток гипофиза крысы (Steinsapir et al., 1998). Показано, что связывание T_4 с активным центром фермента стимулирует ее убиквитинирование, что подавляет активность и способствует деградации D2 в протеасомах (Gereben et al., 2008). Деградация D2 под действием T_4 является основой системы отрицательной обратной связи тиреоидной оси в гипофизе. Повышение концентрации T_4 приводит к 50% снижению активности D2 без изменения содержания мРНК, в результате чего уменьшается экспрессия мРНК β -субъединицы тиреотропного гормона (Christoffolete et al., 2006).

То, что именно T_3 , а не T_4 , осуществляет регуляцию на транскрипционном уровне, подразумевает, что в промоторе D2 должен быть «негативный» TRE, однако, насколько нам известно, его до сих пор не идентифицировали. Возможно, негативные эффекты T_3 на транскрипцию D2 связаны с взаимодействием комплекса лиганд-TR с другими ядерными рецепторами или транскрипционными факторами (Singh et al., 2018). В этом случае влияние T_3 на экспрессию мРНК D2 может быть тканеспецифичным и зависеть от содержания дополнительных транскрипционных факторов. Это предположение согласуется с описанным выше неодинаковым изменением экспрессии D2 в разных тканях при гипертиреозе.

1.4.3 Регуляция адренергическими стимулами

В связи с тем, что в промоторе гена D2 человека, крысы и мыши обнаружен функциональный цАМФ-чувствительный элемент (CRE), ее экспрессия положительно регулируется всеми стимулами, способными увеличивать содержание цАМФ в клетке (Bartha et al., 2000; Gereben et al., 2008). Наиболее исследована цАМФ-зависимая регуляция экспрессии мРНК и активности D2 в бурой жировой ткани крыс, необходимая для обеспечения адаптивного термогенеза. В ответ на холодовую экспозицию происходит активация симпатической нервной системы и выброс норадреналина из нервных волокон. Норадреналин связывается с β -адренорецепторами и увеличивает содержание цАМФ в клетках, в результате чего происходит увеличение содержания мРНК и активности D2. D2, в свою очередь, обеспечивает рост внутриклеточной концентрации T_3 , который усиливает экспрессию разобщающего белка UCP1, обеспечивающего термогенез в буром жире (Bianco et al., 1988; Bianco et al., 2019; Bianco, Silva, 1988; Jones et al., 1986; Silva, Larsen, 1983). В связи с этим уровень симпатической иннервации также может быть одним из факторов, влияющих на экспрессию D2.

1.4.4 Регуляция другими стимулами

Помимо агонистов адренорецепторов, к молекулам, способным увеличивать содержание цАМФ в клетках и таким образом усиливать экспрессию D2, также относятся флавонолы, распространенные компоненты пищи. Одним из наиболее мощных активаторов D2 из этой группы является кемпферол, который продемонстрировал способность к увеличению активности D2 в 50 раз в экспериментах на разных клеточных культурах (Bianco, Conceição da, 2018).

Глюкокортикоиды известны своим негативным действием на сигнальный путь цАМФ. Было показано, что ядерные рецепторы глюкокортикоидов могут мешать транскрипционным факторам связываться с CRE, таким образом ослабляя цАМФ-зависимую транскрипцию генов (Akerblom et al., 1988). В соответствии с этим, глюкокортикоиды должны подавлять экспрессию D2, однако данные литературы о регуляции экспрессии D2 глюкокортикоидами несколько противоречивы. Дексаметазон, синтетический глюкокортикоид, снижал активность D2 в культуре клеток нейробластомы мыши и плаценте человека (Gereben, Salvatore, 2005). В культуре бурых адипоцитов крыс дексаметазон и гидрокортизон также приводили к снижению активности D2 и, кроме того, предотвращали адренергическую цАМФ-зависимую стимуляцию экспрессии мРНК D2 (Martinez-deMena et al., 2016). Интересно, что при этом добавление дексаметазона приводило к небольшому увеличению базального уровня мРНК D2, по-видимому, за счет стабилизации молекулы. В культуре клеток гипофиза крысы дексаметазон также стимулировал экспрессию D2 - вызывал транзиторное увеличение содержания мРНК D2 в 2.5 раза (Kim et al., 1998). По-видимому, регуляция D2 глюкокортикоидами может быть тканеспецифичной, а также происходить на разных уровнях – как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном.

Действие прогестерона также может быть опосредовано цАМФ. Было показано, что активность D2 в матке крыс увеличивается в ответ на прогестерон (Wasco et al., 2003). Более того, у овариэктомированных крыс наблюдается снижение уровня прогестерона и мРНК D2 во всех исследованных тканях, включающих печень, почки, мозг, щитовидную железу и бедренную кость. При этом после овариэктомии наблюдалась значимая положительная корреляция между концентрацией прогестерона в крови и уровнем мРНК D2 (Awad, Alrefaie, 2014). Это позволяет предположить, что тиреоидные дисфункции у женщин в период постменопаузы отчасти связаны с уменьшением локальной активации тиреоидных гормонов.

Активация рецепторов тиреотропного гормона связана с увеличением содержания цАМФ в клетках. При добавлении тиреотропного гормона к культуре клеток щитовидной железы человека наблюдалось увеличение активности и уровня мРНК D2 (Murakami et al., 2001). Увеличение экспрессии мРНК и активности D2 в скелетных мышцах тренированных

мышей также оказалось опосредованно цАМФ-зависимым механизмом (Воссо et al., 2016). В нашей работе, продемонстрировавшей отрицательную корреляцию уровня свободного T_3 в крови и мРНК D2 в сердце у тренированных крыс, этот механизм не был исследован (Борзых et al., 2020).

К прочим факторам, влияющим на экспрессию D2, относятся липополисахарид и связанные с воспалительным ответом факторы. Было показано, что липополисахарид увеличивает содержание мРНК D2 в гипоталамусе и первичной культуре таницитов мышцы по NF κ B-зависимому механизму (Vries De et al., 2014). Интересно, что активность и уровень мРНК D2 в культуре клеток скелетной мышцы человека уменьшались в присутствии фактора некроза опухолей TNF α , хотя он является одним из участников сигнального пути NF κ B (Hosoi et al., 1999).

Спектр факторов, способных регулировать экспрессию D2, очень широк и разнообразен. Такое изобилие участников регуляции может косвенно свидетельствовать о важности фермента, так как его активность подвергается тонкой настройке в соответствии с нуждами ткани.

1.4.5 Регуляция экспрессии дейодиназы 2 типа в сосудах

D2 – основная дейодиназа, которая экспрессируется в сосудах. Ее экспрессия была обнаружена в различных культурах эндотелиальных клеток, гладкомышечных клеток аорты и коронарных артерий человека, а также в аорте, подкожной артерии и артериях тонкого кишечника крыс (Aoki et al., 2015; Kasahara et al., 2006; Mizuma et al., 2001; Sofronova et al., 2017; Yasuzawa-Amano, Toyoda, 2004). В одном исследовании была показана экспрессия D3 в эндотелии кровеносных сосудов пуповины человека (Huang et al., 2003), а в другом детектировали экспрессию всех трех форм дейодиназ в линиях эндотелиальных клеток HMEC-1 и HUVEC, а также в гомогенате аорты крысы (Sabatino et al., 2015). Тем не менее, так как в большинстве работ не обнаружена активность или мРНК других изоформ дейодиназ в стенке артерий, можно считать D2 преобладающей изоформой. В соответствии с этим, уровень экспрессии D2 может быть значимым фактором, определяющим интенсивность геномного действия D2 на сосуды и способным влиять на их вазомоторные реакции. Физиологическая роль D2 в сосудах подтверждается клиническими данными о сосудистых нарушениях, сопровождающих инактивирующий полиморфизм Thr92Ala гена D2. Данный полиморфизм наблюдается у 15-30% людей в выборке из популяции белых европейцев (Dora et al., 2010; Gumieniak et al., 2007). Наличие аллеля Thr92Ala не влияло на содержание свободных тиреоидных гормонов или тиреотропного гормона в крови, но приводило к двухкратному увеличению риска развития гипертензии у носителя полиморфизма даже в случае гетерозиготы

(Gumieniak et al., 2007). Наличие хотя бы одного аллеля Thr92Ala также увеличивало риск развития преэклампсии у беременных женщин. В случае тяжелой преэклампсии у носительниц Thr92Ala рождались дети с более низкой массой тела (Procopciuc et al., 2017).

Несмотря на это, исследования механизмов регуляции экспрессии D2 в сосудах немногочисленны и фрагментарны. Часть работ проведена на клеточных линиях эндотелиальных или гладкомышечных клеток (Mizuma et al., 2001; Sabatino et al., 2015), что ограничивает применимость этих данных. Как упоминалось выше, известно, что уровень экспрессии D2 зависит от тиреоидного статуса организма, но содержание мРНК D2 может изменяться по-разному в разных тканях, а в случае сосудов – в разных регионах кровеносного русла.

В линии эндотелиальных клеток микрососудов кожи человека НМЕС-1 T₃ не влиял на уровень мРНК D2, тогда как T₄ уменьшал ее содержание. При этом уровень белка D2 не изменялся (Sabatino et al., 2015). В экспериментах на культуре гладкомышечных клеток коронарных артерий человека были обнаружены классические эффекты тиреоидных гормонов на экспрессию D2: T₃ в большей степени, чем T₄, снижал уровень мРНК, а T₄ сильнее уменьшал активность фермента (Mizuma et al., 2001).

На данный момент существует всего две работы, в которых оценивали регуляцию экспрессии D2 в артериях *in vivo*. Гипотиреоз не влиял на содержание мРНК, но увеличивал активность D2 в стенке аорты взрослых крыс (Yasuzawa-Amano, Toyoda, 2004). Гипотиреоз также не влиял на уровень мРНК D2 в подкожной артерии и артериях тонкого кишечника 2-недельных крысят (Sofronova et al., 2017). Влияние избытка T₃ *in vivo* на экспрессию D2 в резистивных артериях взрослых животных пока не было изучено.

Стимулирующее влияние агонистов α - и β -адренорецепторов на экспрессию мРНК и активность D2 было показано в аорте крыс (Yasuzawa-Amano, Toyoda, 2004). Аналогичные положительные эффекты синтетических аналогов цАМФ были показаны в экспериментах на клеточной культуре гладкомышечных клеток человека (Kasahara et al., 2006; Mizuma et al., 2001). Основным источником адреноагонистов для артерий в организме являются волокна симпатической нервной системы. При этом плотность иннервации артерий неодинакова в разных органах. В связи с этим представляет большой интерес изучение симпатической регуляции экспрессии D2 в зависимости от плотности иннервации артерии.

К факторам, которые могут влиять на экспрессию D2 в сосудистом русле, относятся глюкокортикоиды и тромбоцитарный фактор роста. Показано, что дексаметазон подавляет активность и уровень мРНК D2 в гладкомышечных клетках сосудов крыс по цАМФ-зависимому механизму (Toyoda, Yasuzawa-Amano, et al., 2009). Тромбоцитарный фактор роста

подавляет экспрессию мРНК D2 в гладкомышечных клетках коронарных сосудов человека (Kasahara et al., 2006)

Нужно отметить, что экспрессия мРНК D2 в сосудах имеет регионарную специфичность: например, у 2-недельных крысят ее уровень в подкожной артерии выше, чем в артериях тонкого кишечника (Sofronova et al., 2017). Гипотетически, такой паттерн экспрессии может быть связан с различным содержанием специфичных для сосудов факторов, например, с уровнем продукции оксида азота. В частности, паттерн содержания мРНК eNOS, основного источника оксида азота в артериях, обратен паттерну экспрессии D2 (Sofronova et al., 2017).

Исходя из того, что D2 является основной дейодиназой сосудов, а регулируемое ею геномное действие тиреоидных гормонов приводит к изменению сократительных ответов артерий, можно предположить, что активность D2 может влиять на их вазомоторные реакции. Насколько нам известно, такой функциональный аспект активности D2 в артериях пока не изучен и данные такого рода в литературе отсутствуют. Подходящим методом в этом случае выглядит культивирование целых артерий (organ culture). В этом случае артерию помещают в питательную среду для культивирования и инкубируют в течение нескольких часов до нескольких суток в CO₂-инкубаторе (5% CO₂). Такой подход позволит оценить влияние ингибитора 5'-дейодирования на сократительные ответы артерий в отсутствие побочных эффектов, которые сопровождали бы его системное введение.

1.5 Негеномный механизм действия тиреоидных гормонов

Данный раздел обзора литературы содержит материалы, опубликованные в (Селиванова, Тарасова, 2020).

Рецепторы и молекулярные механизмы передачи сигнала, обеспечивающие негеномное действие тиреоидных гормонов, весьма разнообразны и тканеспецифичны. Негеномные влияния тиреоидных гормонов на клетки одной и той же ткани могут опосредоваться различными рецепторами, локализованными в разных компартментах клетки – наружной мембране, цитоплазме или митохондриях. В данном разделе будут рассмотрены известные на данный момент рецепторы и сигнальные пути, обеспечивающие негеномное действие тиреоидных гормонов (Рис. 2).

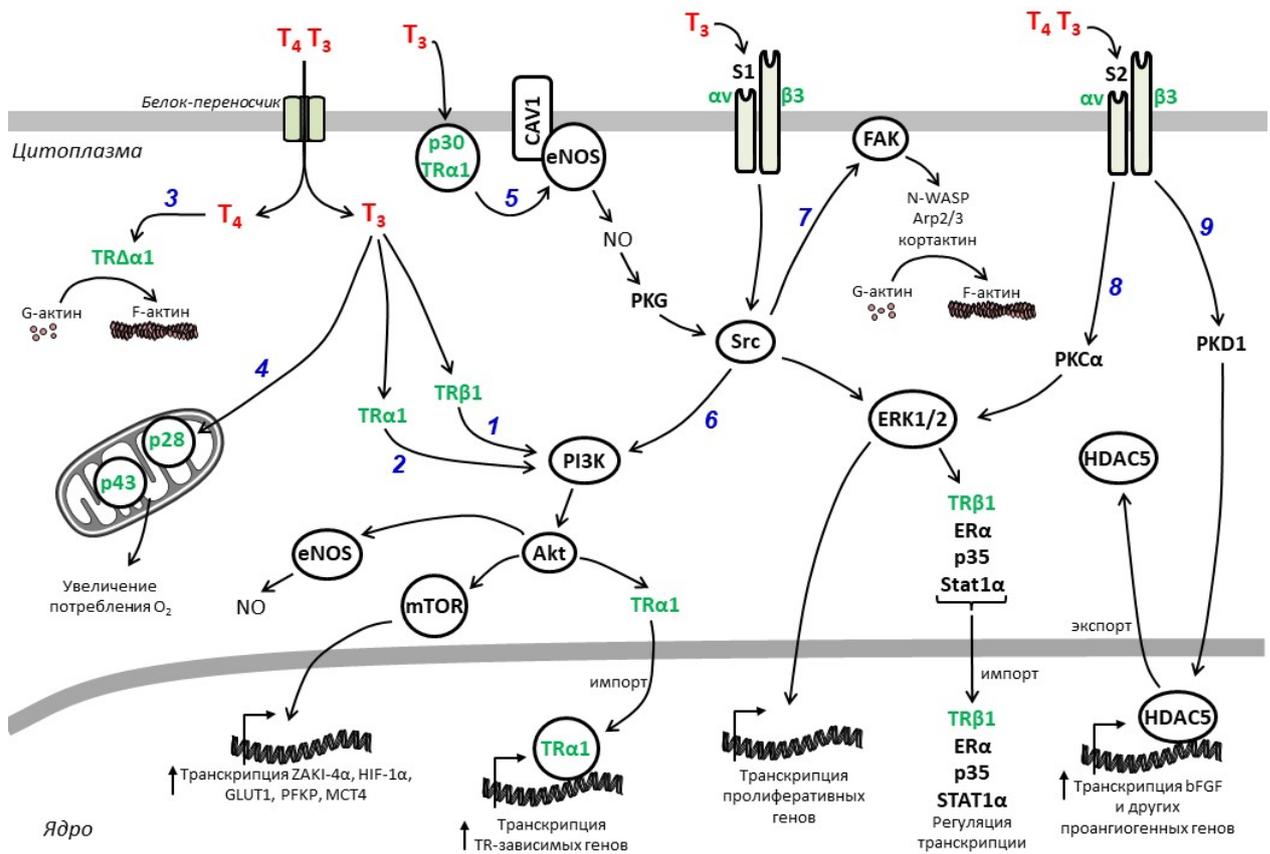


Рис.2. Основные механизмы негеномного действия тиреоидных гормонов. 1 – T_4 через рецептор $TR\Delta\alpha 1$ (укороченная изоформа $TR\alpha 1$) стимулирует полимеризацию актина; 2 – T_3 и T_4 напрямую связываются с цитоплазматическими ферментами и изменяют их активность; 3 – T_3 связывается с митохондриальным белком p28 (укороченная изоформа $TR\alpha 1$), что может увеличивать скорость окислительного фосфорилирования; 4 – T_3 через рецептор $TR\alpha 1$ активирует каскад $PI3K/Akt$, увеличивая активность $eNOS$ и продукцию NO ; 5 – T_3 через рецептор $TR\beta 1$ активирует $PI3K/Akt/mTOR$ каскад, что приводит к повышению экспрессии $HIF-1\alpha$ и белков, регулирующих углеводный обмен клетки; 6 – T_3 связывается с p30 $TR\alpha 1$ (укороченная изоформа $TR\alpha 1$) и последовательно активирует $eNOS$, Src -киназу и $ERK1/2$, что в итоге стимулирует пролиферацию и рост клеток; 7 – T_3 связывается с сайтом S1 интегрин $\alpha v\beta 3$ и через Src -киназу запускает $PI3K/Akt$ каскад, стимулирующий импорт $TR\alpha 1$ в ядро и экспрессию $HIF-1\alpha$; 8 – T_3 связывается с сайтом S1 интегрин $\alpha v\beta 3$ и через Src -киназу активирует FAK , стимулируя полимеризацию актина; 9 – T_3 и T_4 связываются с сайтом S2 интегрин $\alpha v\beta 3$ и через $PKC\alpha$ активируют $ERK1/2$, стимулируя транскрипцию пролиферативных генов и импорт транскрипционных факторов в ядро; 10 – T_3 и T_4 связываются с сайтом S2 интегрин $\alpha v\beta 3$ и активируют $PKD1$, которая стимулирует экспорт $HDAC5$ из ядра, увеличивая транскрипцию проангиогенных генов. Обозначения: αv и $\beta 3$ – субъединицы интегрин $\alpha v\beta 3$, $CAV1$ – кавеолин-1, $eNOS$ – эндотелиальная NO -синтаза, $ER\alpha$ – рецептор эстрогенов, FAK – киназа фокальных контактов, F-актин – фибриллярный актин, G-актин – глобулярный актин, $GLUT1$ – глюкозный транспортер 1, $HDAC5$ – деацетилаза гистонов 5, $MCT4$ – монокарбоксилатный транспортер 4, p35 – активатор циклин-зависимой киназы 5, $PI3K$ – фосфоинозитид-3-киназа, $PFKP$ – фосфофруктокиназа, $PKC\alpha$ – протеинкиназа α , $PKD1$ – протеинкиназа D1, PKG – протеинкиназа G, $TAT1\alpha$ – транскрипционный фактор, $ZAKI-4\alpha$ – эндогенный ингибитор кальциейрина. Стрелками указано активирующее влияние на мишени, если не помечено иное (импорт белков в ядро или их экспорт из ядра). Цитировано по (Селиванова, Тарасова, 2020).

1.5.1 Негеномное действие тиреоидных гормонов, опосредованное цитоплазматическими белками

Негеномное действие тиреоидных гормонов может быть опосредовано функциональными ядерными рецепторами ($TR\alpha 1$ и $TR\beta 1$), локализованными в цитоплазме клетки. Эффекты, инициированные ядерными рецепторами, относятся к негеномным в случае, если для них не требуют связывания рецепторов с ДНК (Flamant et al., 2017). Поскольку ядерные рецепторы обладают более высоким сродством к T_3 , чем к T_4 , данный вид негеномных эффектов инициирует преимущественно T_3 (Schroeder et al., 2014).

Механизм негеномных эффектов, инициируемых $TR\beta 1$, включает в себя образование комплекса с $p85\alpha$, регуляторной субъединицей фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), в цитоплазме клетки. Например, добавление T_3 к культуре фибробластов кожи человека активирует PI3K и запускает каскад, в ходе которого происходит последовательная активация протеинкиназы Akt, ее транслокация в ядро, активация комплекса mTOR и увеличение экспрессии фактора ZAKI-4 α , эндогенного ингибитора кальцинеина (Cao et al., 2005). Кальцинеин является важным участником Ca^{2+} -сигнализации в различных клетках, поэтому изменение его активности под действием T_3 может сказываться на функционировании различных тканей и организма в целом. Аналогичным образом T_3 способен усиливать экспрессию некоторых других генов, включая гены индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 α и его мишеней, регулирующих углеводный обмен клетки (глюкозный транспортер GLUT1, фосфофруктокиназа, монокарбоксилатный транспортер MCT4), что обеспечивает активацию гликолиза и может играть важную роль в адаптации клеток к гипоксии (Moeller et al., 2005). Активация каскада PI3K в результате связывания T_3 с $TR\beta 1$ также наблюдалась в культуре клеток GH4C1 (опухолевые клетки гипофиза крысы). По-видимому, такой негеномный механизм важен для развития нервной системы: у мышей с мутацией $TR\beta 1$, не затрагивающей его классические транскрипционные эффекты, но нарушающей образование комплекса с $p85\alpha$ и, соответственно, активацию PI3K, нарушается созревание пирамидных нейронов в области CA1 гиппокампа (Martin et al., 2014).

Рецептор $TR\alpha 1$ также способен образовывать комплекс с $p85\alpha$ в цитоплазме и активировать PI3K/Akt каскад. В культуре эндотелиальных клеток сосудов человека T_3 запускает данный каскад с последующим фосфорилированием eNOS в течение 10-20 минут (Hiroi et al., 2006). Такая негеномная активация eNOS может объяснять быстрое падение артериального давления, наблюдающееся у мышей в ответ на внутривенное введение T_3 (Hiroi et al., 2006).

Укороченные изоформы ядерных рецепторов, не способные к связыванию с ДНК, также опосредуют негеномные эффекты тиреоидных гормонов. К таким изоформам относятся $TR\Delta\alpha 1$

и TR $\Delta\alpha 2$, которые, в отличие от TR $\alpha 1$ и TR $\alpha 2$, не содержат ДНК-связывающих доменов, и, соответственно, не обладают транскрипционной активностью (Plateroti et al., 2001). Они широко представлены в цитоплазме клеток мозга, кишечника и легких крысы (Chassande et al., 1997). Интересно, что обе изоформы (TR $\Delta\alpha 1$ и TR $\Delta\alpha 2$) обладают более высокой аффинностью к T₄ и rT₃ (транскрипционно неактивный метаболит тиреоидных гормонов), чем к T₃. Рецептор TR $\Delta\alpha 1$ опосредует быстрое увеличение содержания полимеризованного актина при добавлении T₄ или rT₃ к культуре астроцитов (Davis et al., 2008; Siegrist-Kaiser et al., 1990). Этот эффект не связан с изменением содержания мРНК или белка актина в клетках, то есть не зависит от транскрипции. У мышей с нокаутом всех изоформ TR α (TR $\alpha 0/0$), но не с нокаутом только TR $\alpha 2$ и TR $\Delta\alpha 2$ (TR $\alpha 2^{-/-}$) нарушается формирование актинового цитоскелета в астроцитах (Cheng et al., 2010). Так как T₃ не влияет на полимеризацию актина в астроцитах, этот эффект, по всей видимости, опосредован не высокоаффинной к T₃ изоформой TR $\alpha 1$, а именно TR $\Delta\alpha 1$.

1.5.2 Негеномное действие тиреоидных гормонов, опосредованное мембранными белками

Еще пионерские эксперименты по изучению негеномного действия тиреоидных гормонов показали существование мест их связывания на мембране эритроцитов (Botta et al., 1983). Наличие мембранного рецептора тиреоидных гормонов было доказано путем использования конъюгата T₄ с агарозой, который не проникал внутрь клетки, но вызывал такие же эффекты, как и свободный T₄ (Lin et al., 1999).

Мембранными посредниками негеномного действия тиреоидных гормонов могут служить укороченные изоформы ядерных рецепторов. В экспериментах на культурах первичных остеобластов человека (hPOBs) и остеобласт-подобных клеток мыши (MC3T3) T₃ уже через несколько минут повышал уровень фосфорилирования и активности киназы Src, митоген-активируемых протеинкиназ ERK1/2 и киназы Akt. Анализ клеток с флоксированным геном TR α , а также генномодифицированных клеток, экспрессирующих разные изоформы TR $\alpha 1$, показал, что для проявления данного эффекта необходима изоформа p30 TR $\alpha 1$ (30 кДа), которая связана с липидными рафтами мембраны вместе с кавеолином-1 и eNOS. Связывание T₃ с p30 TR $\alpha 1$ сопровождается повышением внутриклеточной концентрации Ca²⁺ и активацией eNOS, а далее – растворимой гуанилатциклазы и протеинкиназ G, Src, ERK1/2 и Akt (Kalyanaraman et al., 2014). Эти данные показывают, что негеномные эффекты T₃, опосредуемые p30 TR $\alpha 1$, могут играть важную роль в созревании и росте кости, так как активируемые каскады участвуют в регуляции пролиферации и выживания остеобластов. В остеобластах, лишенных TR α , нарушалась пролиферация, а введение аденовируса, содержащего p30 TR $\alpha 1$, приводило к ее частичному восстановлению (Kalyanaraman et al., 2014).

Важную роль в мембранной рецепции тиреоидных гормонов играет интегрин $\alpha\beta3$ (Bergh et al., 2005). Интегрины – это трансмембранные белки, обеспечивающие взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом и передачу сигналов к цитоскелету клетки. Они состоят из двух субъединиц – α и β . У млекопитающих описаны 24 вида интегринов, которые образуются в результате комбинации 18 типов α -субъединиц и 8 типов β -субъединиц (Hynes, 1992). Все интегринины обладают большим внеклеточным доменом для связывания белков внеклеточного матрикса, а также других молекул, таких как факторы роста, гормоны, вирусные белки et al. (Lafoya et al., 2018; Robertson 2016). Интегрин $\alpha\beta3$ – самый распространенный у млекопитающих, он экспрессируется практически на всех типах клеток. Это один из 8 интегринов, содержащих сайт узнавания последовательности Arg-Gly-Asp (RGD), с этим сайтом связываются такие молекулы внеклеточного матрикса, как коллаген, витронектин, фибронектин и остеопонтин (Bergh et al., 2005; Xiong et al., 2002). Именно вблизи сайта узнавания RGD расположены идентифицированные при помощи кристаллографического и компьютерного анализа сайты связывания тиреоидных гормонов – S1 и S2 (Freindorf et al., 2012). Взаимодействие T_3 и T_4 с этими сайтами блокируется пептидом RGD или тетраком (дезаминированный аналог тироксина), использование этих блокаторов позволяет подтвердить роль интегринина $\alpha\beta3$ как посредника негеномных эффектов тиреоидных гормонов (Lin et al., 2009).

Домен S1 специфически связывает T_3 и активирует ассоциированную с внутриклеточной петлей интегринина Src-киназу, как было показано в экспериментах на клеточной линии глиомы человека U-87 MG (Lin et al., 2009). Src-киназа активирует каскад PI3K/Akt, в итоге происходит перемещение ядерных рецепторов TR α 1 из цитоплазмы в ядро, а также увеличение экспрессии гена HIF-1 α , повышающего устойчивость клеток к гипоксии (Lin et al., 2009). Помимо этого, в результате связывания T_3 с интегринином и последующей активации Src-киназы и PI3K может происходить активация киназы фокальных контактов (ФАК), и белков, регулирующих полимеризацию актина, в частности, кортактина, N-WASP, Arp2/3. В клеточной линии рака молочной железы T-47D это приводит к реорганизации актинового цитоскелета, усилению адгезии и миграции клеток (Uzair et al., 2019).

Домен S2 способен связывать как T_3 , так и T_4 , однако обладает более высоким сродством к T_4 (Lin et al., 2009). Присоединение T_4 к домену S2 приводит к активации фосфолипазы C и далее протеинкиназы C α , которая фосфорилирует и активирует ERK1/2 (Lin et al., 2009). ERK1/2 перемещаются в ядро, где фосфорилируют TR β 1, в результате чего увеличивается количество рекрутированных TR β 1 коактиваторов транскрипции (Davis et al., 2000). Кроме того, ERK1/2 могут фосфорилировать в цитоплазме такие белки как TR β 1, рецептор эстрогенов

ER α , транскрипционный фактор STAT1 α и белок p35 (активатор циклин-зависимой киназы 5), стимулируя их транслокацию в ядро (Cao et al., 2009; Lin et al., 2009; Lin et al., 1999).

Помимо сигнального пути ERK1/2, связывание T₄ с интегрином может активировать еще один сигнальный каскад, впервые показанный в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC) (Liu et al., 2014). В ходе него при взаимодействии T₄ с интегрином $\alpha v \beta 3$ происходит активация протеинкиназы D1 (прежнее название - C μ), которая фосфорилирует деацетилазу гистонов IIa класса (HDAC5). HDAC5 подвергается экспорту из ядра, благодаря этому происходит усиление транскрипции генов-мишеней, отвечающих за ангиогенез, в том числе основного фактора роста фибробластов (bFGF). В конечном итоге T₄ стимулирует миграцию эндотелиальных клеток и образование капилляроподобных трубочек – предшественников сосудов (Liu et al., 2014).

Нужно отметить, что на данный момент не для всех известных негеномных эффектов установлены опосредующие их рецепторы и сопряженные с ними сигнальные каскады. Например, T₃ стимулирует встраивание в мембрану и активность Na⁺/K⁺-АТФазы в альвеолярных клетках легких крыс за счет активации Src-киназы, PI3K и ERK1/2, однако до сих пор неизвестно, какой тип рецепторов опосредует эти эффекты (Lei 2011). Часть негеномных эффектов тиреоидных гормонов изучена лишь на феноменологическом уровне, в том числе, механизмы их быстрого влияния на тонус кровеносных сосудов (Axelband et al., 2010).

1.5.3 Негеномное действие тиреоидных гормонов на сосудистую систему

Как следует из выраженных изменений кровообращения при нарушении эутиреоидного статуса, тиреоидные гормоны играют важную роль в регуляции тонуса сосудов. Традиционно все изменения сосудистого русла, наблюдаемые при гипо- или гипертиреозе, связывали с их геномным действием. Тем не менее, по всей видимости, негеномное действие также может вносить свой вклад в наблюдаемые изменения, в частности снижение периферического сопротивления сосудов. Пока неизвестно, как соотносится вклад геномных и негеномных эффектов тиреоидных гормонов в изменения гемодинамики, наблюдаемые при нарушениях тиреоидного статуса. Однако сходные изменения тонуса артерий при остром и хроническом гипертиреозе (Deng et al., 2010; Iwata, Honda, 2004), а также быстрая динамика сосудорасширительных реакций на T₃ или T₄ (Zwaveling et al., 1997) предполагают, что вклад негеномных эффектов в тиреоидную регуляцию тонуса сосудов может быть весьма значительным.

Снижение периферического сопротивления сосудов при гипертиреозе может быть связано, во-первых, с ростом и ветвлением сосудистого русла, то есть с ангиогенезом; во-

вторых, с вазодилатацией, то есть со снижением тонуса сосудов. Как ангиогенез, так и вазодилатация могут быть результатом негеномного действия тиреоидных гормонов.

1.5.3.1 Негеномное действие тиреоидных гормонов на ангиогенез

Регуляторами ангиогенеза являются как T_4 , так и T_3 , молекулярные механизмы влияния которых на рост сосудов уже рассматривались выше (см. 1.5.2). T_4 инициирует ангиогенез путем связывания с сайтом S2 интегрин $\alpha v \beta 3$ (Liu et al., 2014). В результате активации каскада $\alpha v \beta 3$ /PKD/HDAC5 в эндотелиальных клетках происходит стимуляция экспрессии проангиогенных генов, в том числе гена основного фактора роста фибробластов bFGF (Liu et al., 2014). Важно, что T_4 способен вызывать ангиогенный эффект в концентрациях 10-100 нМ (Bergh et al., 2005), что примерно соответствует физиологическим концентрациям T_4 в крови (Gaynullina et al., 2017).

Помимо стимуляции экспрессии bFGF, тиреоидные гормоны способны вызывать ангиогенез через увеличение экспрессии HIF-1 α . Индукция транскрипции этого гена происходит при связывании T_3 с S1 сайтом интегрин $\alpha v \beta 3$ (Lin et al., 2009). Именно увеличение экспрессии HIF-1 α опосредует стимуляцию ангиогенеза при гипоксии (Luidens et al., 2010).

Тетрак (ингибитор интегрин $\alpha v \beta 3$) подавляет влияние тиреоидных гормонов на ангиогенез (Balzan et al., 2013; Yoshida et al., 2012). Вместе с тем показано, что тетрак может оказывать на ангиогенез собственное влияние, а именно ингибировать его в отсутствие тиреоидных гормонов. По всей видимости, это связано с влиянием тетрака на взаимодействие между интегрином $\alpha v \beta 3$ и рецепторами ангиогенных факторов роста VEGF и bFGF (Luidens et al., 2010; Mousa et al., 2008).

1.5.3.2 Негеномное действие тиреоидных гормонов на тонус сосудов

Для разделения негеномных и геномных эффектов на тонус сосудов, как правило, используют временной фактор, относя быстрые изменения к негеномному влиянию, а отставленные во времени – к геномному (Gachkar et al., 2019). Эксперименты *in vivo* или на изолированных сосудах являются более физиологичными, однако они ограничивают спектр молекулярных методов, которые можно использовать для изучения механизмов негеномного действия. В связи с этим исследование молекулярных механизмов негеномного тиреоидного влияния часто проводится в культуре эндотелиальных или гладкомышечных клеток сосудов (Hiroi et al., 2006; Samuel et al., 2017), хотя результаты таких экспериментов не обязательно воспроизводятся на уровне сосудистых реакций.

Наиболее явным и известным уже продолжительное время негеномным эффектом тиреоидных гормонов на сосуды является быстрое расширение сосудов (вазодилатация), которое развивается в течение нескольких минут после добавления гормона (Barreto-Chaves et al., 2011; Geist et al., 2021; Yoneda et al., 1998). Такое влияние тиреоидных гормонов обнаружено у крысы (Lozano-Cuenca et al., 2016), мыши (Gachkar et al., 2019), хомяка (Colantuoni et al., 2005), кролика (Kimura et al., 2006) и человека (Krasner et al., 1997; Schmidt et al., 2002). Этот эффект наблюдается как в артериях эластического типа, таких как аорта (Lozano-Cuenca et al., 2016) или бедренная артерия (Cai et al., 2015), так и в более мелких артериях мышечного типа, например, в коронарных артериях (Yoneda et al., 1998), артериях тонкого кишечника (Geist et al., 2021), внутренней грудной артерии (Krasner et al., 1997) и артериолах скелетных мышц (Park et al., 1997). Обобщение данных о механизмах быстрой вазодилатации под действием тиреоидных гормонов приведено в таблице 2.

Таблица 2. Механизмы негеномного влияния тиреоидных гормонов в артериях разных органов, а также в культуре гладкомышечных или эндотелиальных клеток сосудов.

Объект исследования	Форма гормона, вызывающая вазодилатацию	Участие эндотелия	Механизм вазодилатации
Аорта крысы и мышцы	T₃ (Carrillo-Sepulveda et al., 2010; Gachkar et al., 2019; Lozano-Cuenca et al., 2016); T₄ не исследован	Эндотелий участвует (Lozano-Cuenca et al., 2016); Эндотелий не участвует (Carrillo-Sepulveda et al., 2010);	Продукция NO в эндотелии (Lozano-Cuenca et al., 2016); Продукция NO в ГМК (Carrillo-Sepulveda et al., 2010)
Коронарные сосуды крысы	T₃=T₄ (Yoneda et al., 1998)	Не исследовано	Не связан с продукцией NO (Yoneda et al., 1998)
Бедренная артерия крысы и мышцы	T₃ (Cai et al., 2015; Geist et al., 2021); T₄ не исследован	Эндотелий не участвует (Cai et al., 2015)	Не исследован
Артериолы скелетных мышц крысы	T₃>T₄ (Park et al., 1997)	Эндотелий участвует наравне с гладкой мышцей (Park et al., 1997)	Связан с продукцией NO и простагличина эндотелием (Park et al., 1997)
Артерии тонкого кишечника крысы и мышцы	T₃ (Cai et al., 2015; Geist et al., 2021); T₄>T₃ (Zwaveling et al., 1997)	Эндотелий участвует (Geist et al., 2021); Эндотелий не участвует (Cai et al., 2015) Эндотелий участвует наравне с гладкой мышцей (Zwaveling, et al., 1997)	Не связан с продукцией NO (Cai et al., 2015); Связан с продукцией NO (Geist et al., 2021; Zwaveling et al., 1997)

См. продолжение на следующей странице

Таблица 2. Продолжение

Объект исследования	Форма гормона, вызывающая вазодилатацию	Участие эндотелия	Механизм вазодилатации
Культура эндотелиальных клеток сосудов	T ₃ (Hiroi et al., 2006; Samuel et al., 2017); T ₃ >T ₄ (Aoki et al., 2015)	-	Связан с активацией сигнального пути TR α 1/PI3K/Akt (Aoki et al., 2015; Geist et al., 2021; Hiroi et al., 2006; Samuel et al., 2017)(Aoki et al., 2015; Geist et al., 2021; Hiroi et al., 2006) и увеличением продукции NO в результате активации eNOS (Geist et al., 2021; Hiroi et al., 2006; Samuel et al., 2017)
Культура гладкомышечных клеток сосудов	T ₃ (Carrillo-Sepulveda et al., 2010; Ojamaa et al., 1996; Samuel et al., 2017); T₄ не исследован	-	Не связан с продукцией NO (Ojamaa et al., 1996); Связан с опосредованной PI3K/Akt продукцией NO в результате активности nNOS и iNOS (Carrillo-Sepulveda et al., 2010) и активацией пути PKG/VASP (Samuel et al., 2017)

В большинстве экспериментов исследовали влияние только одной формы тиреоидных гормонов – T₃, однако в некоторых работах было проведено сравнение сосудорасширительных эффектов T₃ и T₄. Результаты такого сравнения несколько противоречивы: показано, что в коронарных артериях крысы T₃ и T₄ вызывают сопоставимые по величине реакции расслабления (Yoneda et al., 1998), тогда как в артериях тонкого кишечника крысы T₄ обладает более выраженным эффектом по сравнению с T₃ (Zwaveling et al., 1997). В мелких артериолах скелетных мышц крысы, напротив, более выражено влияние T₃ (Park et al., 1997). Такая неоднозначность экспериментальных данных предполагает, что в сосудах разных органов, а также на разных участках сосудистого русла негеномные эффекты тиреоидных гормонов могут

быть опосредованы рецепторами, различающимися по аффинности к T_3 и T_4 (цитоплазматические или мембранные рецепторы или же разные сайты связывания интегрина $\alpha v \beta 3$ (Рис.2)).

Нужно отметить, что концентрации, в которых T_4 или T_3 способны вызывать расслабление сосудов, как правило, превышают концентрации этих гормонов в крови. Например, у крыс концентрация общего T_3 в сыворотке крови составляет несколько нмоль/л, а общего T_4 – до 100 нмоль/л (Gaynullina et al., 2017). Вместе с тем T_3 оказывает расслабляющее влияние на артерии крысы лишь в концентрации 100 нМ и выше (Carrillo-Sepulveda et al., 2010; Lozano-Cuenca et al., 2016). Интересно, что у мыши влияние T_3 на сходные артерии проявляется в концентрации, как минимум, на порядок более низкой, чем у крысы (Gachkar et al., 2019; Geist et al., 2021), несмотря на сопоставимое содержание T_3 в крови этих двух видов грызунов. Для T_4 концентрация, в которой он вызывает расслабление мелких артерий крысы, также на порядок выше физиологической – более 1 мкМ (Zwaveling et al., 1997). Тем не менее, быструю вазодилатацию, вызываемую тиреоидными гормонами, нельзя считать лишь экспериментальным феноменом. Во-первых, в дистальном участке сосудистого русла эффективные концентрации тиреоидных гормонов значительно ниже, чем в более крупных сосудах: T_3 может вызывать расширение артериол, начиная с концентрации в несколько нМ (Colantuoni et al., 2005; Park et al., 1997), что лишь немного выходит за рамки физиологического диапазона концентраций. Во-вторых, известно, что в условиях естественной перфузии кровью сосуды более чувствительны ко многим регуляторным влияниям, чем в изолированном состоянии, в отсутствии потенцирующего влияния факторов, циркулирующих в крови (Mashina et al., 1988). По-видимому, тиреоидные гормоны не являются исключением, поскольку в условиях *in vivo* сосуды реагируют на более низкие концентрации этих гормонов, чем в условиях *in vitro* (Colantuoni et al., 2005; Napoli et al., 2007). Таким образом, прямое негеномное действие тиреоидных гормонов на сосуды может быть одним из физиологических механизмов регуляции их тонуса и сопротивления кровотоку. Хотя такое влияние более выражено в мелких артериолах, из-за методологических ограничений также необходимы эксперименты на более крупных артериях, позволяющие получить достаточную массу ткани для исследования механизмов тиреоидного влияния биохимическими и молекулярно-биологическими методами.

Изменение тонуса кровеносных сосудов происходит в результате сокращения или расслабления расположенных в их стенке гладкомышечных клеток, а выстилающий сосуды изнутри эндотелий воспринимает «химические» сигналы из крови и в ответ секретирует вещества, которые в основном обладают сосудорасширяющим действием (Гайнуллина и др., 2013; Mallat et al., 2017). Сопоставление эффектов тиреоидных гормонов на сосудистые препараты с сохраненным и удаленным эндотелием показало, что мишенью гормонов могут

являться как эндотелиальные, так и гладкомышечные клетки сосудистой стенки. В экспериментах на препаратах аорты крысы и артерий тонкого кишечника мышцы расслабление в ответ на T_3 исчезало после удаления эндотелия (Geist et al., 2021; Lozano-Cuenca et al., 2016). В опытах на артериолах скелетных мышц крыс было обнаружено, что удаление эндотелия ослабляет, но не предотвращает вазодилатацию в ответ на T_3 , то есть гормон способен воздействовать как на эндотелий, так и на гладкую мышцу (Park et al., 1997). Вместе с тем в бедренной артерии крысы была показана эндотелий-независимая природа индуцированного T_3 расслабления (Cai et al., 2015).

Наиболее функционально значимый механизм участия эндотелия в расширении сосудов связан с продукцией им оксида азота за счет активности эндотелиальной изоформы NO-синтазы (Гайнуллина и др., 2013). В аорте крысы расслабление в ответ на T_3 исчезало как под действием ингибиторов NO-синтазы или растворимой гуанилатциклазы (основная мишень NO в гладкомышечных клетках), как и при полном удалении эндотелия (Lozano-Cuenca et al., 2016). В артериях тонкого кишечника и артериолах скелетных мышц крысы, где расслабление в ответ на T_3 частично зависит от эндотелия, ингибирование синтеза NO приводило к ослаблению вызванной T_3 или T_4 вазодилатации, но не подавляло ее полностью (Park et al., 1997; Zwaveling et al., 1997). В бедренной артерии, которая расслабляется под действием тиреоидных гормонов независимо от эндотелия, ингибирование синтеза NO также не влияло на вазодилатацию (Cai et al., 2015). Расслабление коронарных артерий в ответ на тиреоидные гормоны также не зависело от продукции NO (Yoneda et al., 1998).

В ряде работ показано, что тиреоидные гормоны могут повышать синтез NO и в гладкомышечных клетках сосудов. При добавлении конкурентного ингибитора NO-синтазы L-NAME наблюдалось уменьшение релаксирующего эффекта T_3 на препараты аорты с удаленным эндотелием (Carrillo-Sepulveda et al., 2010). Такое влияние L-NAME авторы связали с продукцией NO в гладкомышечных клетках и, в подтверждение этому, продемонстрировали повышение экспрессии нейрональной и индуцибельной изоформ NO-синтазы в культуре гладкомышечных клеток аорты крысы уже после 30-мин инкубации с T_3 (Carrillo-Sepulveda et al., 2010). В соответствии с этим, инкубация гладкомышечных клеток сосудов с T_3 приводила к фосфорилированию VASP – мишени, активируемой оксидом азота протеинкиназы G (PKG), маркера расслабления клетки (Samuel et al., 2017). Однако в экспериментах другой научной группы, также выполненных на культуре гладкомышечных клеток аорты крысы, было показано, что вызванное T_3 ослабление сокращения клеток (регистрируемое по изменению натяжения подложки) не связано с повышением синтеза NO (Ojamaa et al., 1996). В этой же работе не было выявлено эффектов T_3 на продукцию NO и содержание цГМФ в культуре эндотелиальных клеток аорты свиньи (Ojamaa et al., 1996).

Изучение механизмов негеномного влияния тиреоидных гормонов на эндотелий-сосудов проводилось в экспериментах на культуре эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC) и аорты быка (Hiroi et al., 2006). Было показано, что в цитоплазме эндотелиальных клеток T_3 связывается с комплексом ядерного рецептора $TR\alpha 1$ и регуляторной субъединицы p85 PI3K, что приводит к активации PI3K и Akt, фосфорилированию eNOS и повышению ее активности. Эти результаты согласуются с данными экспериментов с использованием мышей с нокаутом гена, кодирующего $TR\alpha 1$ ($TR\alpha^{0/0}$): артерии тонкого кишечника таких животных не расслабляются в ответ на T_3 (Geist et al., 2021; Liu et al., 2014). Нужно отметить, что у мышей с генотипом $TR\alpha 0/0$ не образуются все изоформы ядерных рецепторов $TR\alpha$, в том числе и укороченные, которые также могут опосредовать другие негеномные эффекты T_3 (Flamant, Samarut, 2003; Geist et al., 2021) (Рис.2).

Однако результаты работы (Aoki et al., 2015; Geist et al., 2021; Hiroi et al., 2006; Samuel et al., 2017) не объясняют механизм эндотелий- и NO-независимого расслабления сосудов под действием тиреоидных гормонов. Этот феномен, а также механизм негеномного действия T_4 на артерии пока остается предметом дальнейших исследований.

Таким образом, негеномное действие тиреоидных гормонов – это важный аспект их регуляторного влияния в организме. Молекулярные механизмы негеномного влияния тиреоидных гормонов на сосудистую систему требуют дальнейшего изучения, при этом необходимо учитывать, что рецепторы и участники индуцируемых гормонами сигнальных каскадов могут различаться в сосудах разных органов или же в сосудах, расположенных на разных порядках ветвления сосудистого русла в одном органе. В том числе, разнообразие молекулярных механизмов, опосредующих негеномные эффекты тиреоидных гормонов, может объяснить неодинаковые изменения регуляции кровотока в разных органах при гипо- или гипертиреозе. Поскольку негеномные эффекты тиреоидных гормонов могут быть задействованы в развитии сердечно-сосудистых патологий, связанных с нарушениями тиреоидного статуса, изучение их механизмов актуально и с практической точки зрения: оно позволит выявить новые мишени для терапии сердечно-сосудистых нарушений, а также расширит диапазон терапевтического применения тиреоидных гормонов и их производных.

Можно заключить, что на данный момент многие важные аспекты как геномной, так и негеномной тиреоидной регуляции сосудов остаются не исследованными, в том числе: регуляция экспрессии и функциональная роль дейодиназы 2 типа как одного из факторов, определяющего интенсивность геномных эффектов тиреоидных гормонов, а также детальный механизм негеномных влияний тиреоидных гормонов на вазомоторные реакции резистивных артерий.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Экспериментальные животные

В экспериментах использовали половозрелых белых крыс Вистар, полученных из вивария ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии (г. Москва) и вивария ГНЦ РФ ИМБП РАН (г. Москва). При работе с животными соблюдались требования, сформулированные в Директиве Совета Европейского сообщества 2010/63/EU об использовании животных для экспериментальных исследований. Заявки на проведение экспериментов были одобрены комиссией по биоэтике МГУ. Крыс содержали в стандартных условиях комнаты для передержки животных кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова при 12-часовом световом дне (период яркого освещения 09:00-21:00) при свободном доступе к пище и воде. Время адаптации животных к условиям содержания после транспортировки составляло не менее 7 дней.

2.2 Объект исследования

В качестве основного объекта исследования была выбрана артерия икроножной мышцы (суральная артерия, *a. suralis*). Это артерия мышечного типа, обеспечивающая питание кровью скелетной мышцы задней конечности. Она имеет две ветви: медиальную и латеральную (внешнюю и внутреннюю, соответственно), снабжающих кровью соответствующие головки икроножной мышцы. В предварительной серии экспериментов мы показали, что две ветви суральной артерии сходны по реакциям на различные регуляторные воздействия. Поэтому далее в экспериментах использовали обе ветви, равномерно распределяя сегменты латеральной и медиальной ветвей между экспериментальными группами. Для сравнения в исследованиях, посвященных регуляции экспрессии D2 *in vivo*, использовали артерии тонкого кишечника (ветви верхней брыжеечной артерии 2-3 порядка ветвления, *a. mesenterica*).

Выбор этих двух типов артерий был обусловлен:

- 1) их принадлежностью к резистивным артериям, тонус которых определяет уровень системного артериального давления (Magder, 2018);
- 2) принадлежностью к разным в функциональном отношении регионам сосудистого русла;
- 3) функциональными отличиями, в частности, разным уровнем экспрессии eNOS и разной плотностью симпатической иннервации.

В подготовительной части работы было проведено сравнение характеристик этих двух типов артерий с использованием методов визуализации интрамуральных адренергических нервных волокон и ПЦР-РВ.

2.3 Экспериментальные модели

Для изучения влияния тиреоидного статуса, хронической неонатальной десимпатизации и хронического подавления синтеза NO на уровень экспрессии D2 в артериях крыс были использованы соответствующие экспериментальные модели.

2.3.1 Модель хронического гипертиреоза

В эксперименте по изучению влияния тиреоидного статуса на экспрессию мРНК D2 использовали две группы половозрелых самцов крыс: контроль и гипертиреоз.

Гипертиреоз вызывали путем подкожного введения раствора T₃ (300 мкг/кг, объем введения 1 мкл/кг, Sigma, Aldrich, T2877, США) в область холки каждый второй день. В связи с низкой растворимостью гормона в воде сначала готовили маточный раствор T₃ 30 мг/мл в 2 М NaOH, который затем разводили в 100 раз фосфатно-солевым буфером, титровали HCl до достижения pH=8.1 (титрование раствора до более нейтрального значения pH не представлялось возможным ввиду выпадения гормона в осадок). Маточный раствор и раствор для инъекций готовили непосредственно в день введения крысам, для введения использовали инсулиновый шприц с иглой 27G. Использование NaOH в качестве растворителя при инъекциях тиреоидных гормонов является стандартным методическим приемом (Rodriguez-Gomez et al., 2013). Использование другого растворителя, например, диметилсульфоксида (ДМСО), было нежелательным в связи с его потенциальными побочными эффектами при введении крысам в достаточно большом объеме (250-300 мкл/крысу).

Для исключения потенциального влияния многократных инъекций раствора со сравнительно высоким pH на результаты эксперимента контрольным крысам проводили подкожные инъекции растворителя в эквивалентном объеме.

Общая длительность воздействия составила 5 недель. На протяжении 5 недель регулярно проводили учет массы тела животных и объема потребляемой ими жидкости. На 4 неделе эксперимента у крыс проводили адаптационное и основное измерения систолического артериального давления плетизмографическим методом (tail-cuff) с интервалом в 4 дня. В конце 5 недели эксперимента крыс декапитировали при помощи гильотины, собирали смешанную кровь и выделяли суральные артерии. Часть суральных артерий сразу помещали в стабилизирующий РНК буфер RNA-later (Qiagen, Голландия), через 60 минут замораживали и хранили при температуре -20°C до последующего анализа экспрессии генов при помощи ПЦР-

РВ. Другую часть суральных артерий замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C до последующего анализа содержания белка методом Вестерн блот.

2.3.2 Модель хронической неонатальной десимпатизации

Для изучения роли симпатической иннервации в регуляции экспрессии мРНК D2 использовали модель хронической неонатальной десимпатизации с помощью гуанетидина сульфата (Santa Cruz Biotechnology, 645-43-2, США) (Kostyunina et al., 2020). Введение гуанетидина с 1-2 дня после рождения предотвращает развитие нейронов симпатических ганглиев у крыс (Родионов и др., 1988). Для использования этой модели было необходимо получить новорожденных крысят, в связи с этим половозрелых самцов и самок ссаживали на неделю в клетку в соотношении 2:3 или 2:2. Затем самок содержали в индивидуальных клетках и проводили ежедневный мониторинг их состояния здоровья и массы тела. В день родов самок и их потомство взвешивали, после чего ограничивали помет до 8 голов удалением крысят женского пола. Самок вместе с потомством случайным образом распределяли на две группы: контроль и десимпатизация. В группе десимпатизация крысятам делали подкожные инъекции гуанетидина в области холки со второго по 54-56 день жизни шесть раз в неделю. Для введения использовали инсулиновый шприц объемом 0.5 мл с иглой 30G. Гуанетидин растворяли в физиологическом растворе (0.9% NaCl), крысятам контрольной группы вводили эквивалентный объем растворителя. Раствор гуанетидина готовили каждые два дня. Доза гуанетидина со 2 по 14 день жизни составляла 25 мг/кг, а с 15 по 54–56 день жизни – 50 мг/кг. Объем введения составлял 1–2.5 мкл/г.

На протяжении всего эксперимента осуществляли мониторинг массы тела животных. Чтобы исключить острое влияние гуанетидина, инъекции прекращали за два дня до взятия животного в эксперимент. В день эксперимента животных декапитировали при помощи гильотины, собирали смешанную кровь и выделяли суральные и брыжеечные артерии. Большую часть артерий сразу помещали в стабилизирующий РНК буфер RNA-later (Qiagen, Голландия), и через 60 минут замораживали и хранили при температуре -20°C до последующего анализа экспрессии генов методом ПЦР-РВ. Часть суральных артерий замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C до последующего анализа содержания белка методом Вестерн блот. В части артерий проводили оценку плотности сплетения адренергических нервных волокон.

2.3.3 Модель хронического подавления синтеза оксида азота

Для изучения роли NO в регуляции экспрессии D2 использовали модель хронического подавления синтеза оксида азота. Половозрелых самцов крыс случайным образом распределяли

на две группы: контрольную и L-NAME. Крысы группы L-NAME получали конкурентный ингибитор NO-синтазы L-NAME (Chem Impex, 03026, США) с питьевой водой в концентрации 500 мг/л в течение 11 дней. Крысы контрольной группы получали обычную питьевую воду. На протяжении всего эксперимента проводили мониторинг массы тела и потребления жидкости животными. Для верификации модели у всех животных несколько раз измеряли систолическое артериальное давление плетизмографическим методом (tail-cuff): за три дня и накануне эксперимента, а также на шестой и 11 дни потребления L-NAME. На 12 день после начала потребления ингибитора крыс декапитировали при помощи гильотины (при этом собирали смешанную кровь) и выделяли суральные и брыжеечные артерии. Артерии сразу помещали в стабилизирующий РНК буфер RNA-later (Qiagen, Голландия), и через 60 минут замораживали и хранили при температуре -20°C до последующего анализа экспрессии генов при помощи ПЦР-РВ. Часть суральных артерий замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C до последующего анализа содержания белка методом Вестерн блот.

2.3.4 Методики, использовавшиеся для характеристики экспериментальных моделей

Для характеристики использованных экспериментальных моделей оценивали содержание тиреоидных гормонов и метаболитов NO в крови крыс, измеряли систолическое артериальное давление неинвазивным способом, а также проводили визуализацию сплетения адренергических нервных волокон в стенке артерий.

2.3.4.1 Получение сыворотки крови

Цельную кровь собирали после декапитации в стеклянный стакан, 20 минут держали при комнатной температуре ($20-25^{\circ}\text{C}$), а затем на 40 минут помещали в холодильник (4°C) для ретракции сгустка. Далее пробы центрифугировали 15 минут при 5000 об/мин (1677 g, Eppendorf Minispin, ротор F-45-12-11), отбирали сыворотку, замораживали ее и хранили при -20°C до проведения анализа.

2.3.4.2 Определение концентраций тиреоидных гормонов в сыворотке крови

Для определения концентрации тиреоидных гормонов использовали метод одностадийного иммуноферментного анализа, основанного на конкуренции гормона из исследуемой сыворотки и гормона, меченого пероксидазой хрена, за центры связывания специфичных к гормону антител, иммобилизованных на поверхности лунок планшета.

Измерения общего и свободного T_3 и T_4 проводили с использованием коммерческих наборов компании ЗАО «НВО Иммунотех» (Россия) согласно инструкциям производителя.

Оптическую плотность лунок оценивали при помощи планшетного ридера Multiskan EX (Thermo Electron Corporation, Германия). Каждый образец измеряли в двух повторностях (дуплетах), при обработке их значения усредняли.

2.3.4.3 Определение метаболитов NO в сыворотке крови

Содержание метаболитов NO в сыворотке проводили по методу Грисса (Giustarini et al., 2008). Для этого равный объем сыворотки смешивали с 0.5 М ZnCl₂, встряхивали на вортексе в течение 1-2 мин и центрифугировали 15 мин при 10000 об/мин (6700 g, Eppendorf Minispin, ротор F-45-12-11), затем отбирали супернатант. К супернатанту добавляли два объема хлороформа, перемешивали, центрифугировали 10 мин в тех же условиях. Полученный депротеинизированный и обезжиренный супернатант вносили в лунки планшета дуплетами по 80 мкл, затем добавляли 80 мкл 0.8% VCl₃, 40 мкл 2% сульфаниламида и 40 мкл 0.1% N-нафтилэтилендиамина и инкубировали в течение 60 минут в термостате при 37°C для восстановления нитратов до нитритов. После инкубации измеряли оптическую плотность на ридере Multiskan EX (Thermo Electron Corporation, Германия) при 540 нм. Для вычисления концентрации сравнивали полученные значения с калибровочной прямой, построенной с использованием стандартных растворов NaNO₂ с концентрациями от 0 до 100 мкМ. Эффективность восстановления оценивали по пробе с 100 мкМ NaNO₃.

2.3.4.4 Измерение систолического артериального давления плетизмографическим методом (tail cuff)

Определение систолического артериального давления проводили плетизмографическим методом с использованием системы «Систола» (Нейроботикс, Россия). Все измерения артериального давления проводили в одно и то же время суток (с 14:00 до 18:00).

Крысу нагревали в клетке, расположенной на электрической грелке с температурой около 30-35°C, на 10 минут. После животное помещали в рестрейнер подходящего размера. Рестрейнер с крысой ставили на аналогичную электрическую грелку на столе и накрывали переднюю часть рестрейнера салфеткой из темной непрозрачной ткани. На хвосте крысы располагали манжету, а дистально от нее – инфракрасный датчик пульса. При наличии выраженной пульсовой волны повышали давление воздуха в манжете до 200 мм рт. ст, затем медленно снижали его до 50 мм рт. ст. При обработке записей уровень систолического давления определяли как давление в манжете, при котором появляются пики пульсовой волны. Для каждого животного проводили не менее пяти измерений (в зависимости от сходимости результатов), полученные значения усредняли.

2.3.4.5 Визуализация адренергических волокон в стенке артерий

Для сравнения плотности симпатической иннервации суральных и брыжеечных артерий, а также для подтверждения эффективности неонатальной десимпатизации исследовали морфологию сплетения адренергических нервных волокон в стенке артерий. Визуализация волокон происходила благодаря образованию флуоресцирующего комплекса норадреналина с глиоксиловой кислотой (Axelsson et al., 1972; Björklund et al., 1972).

После декапитации часть тела с артерией (фрагмент тонкого кишечника или задняя конечность) помещали в чашку, залитую полимером Sylgard, и закрепляли при помощи инъекционных игл. После этого наливали в чашку холодный (4°C) препаративный раствор следующего состава, mM: NaCl 145; KCl 4.5; CaCl₂ 0.1; MgSO₄ 1; NaH₂PO₄ 1.2; ЭДТА 0.025; HEPES 5 (pH = 7.4). Затем очищали артерию от жировой ткани и близлежащих вен при помощи хирургических микроножниц и тонкого пинцета под бинокулярным микроскопом Leica EZ4 (Leica Microsystems, Германия). После этого артерии разрезали вдоль, промывали в препаративном растворе, и инкубировали 30 минут при комнатной температуре в фосфатно-солевом растворе (NaCl 90 mM, Na₂HPO₄*12H₂O 10 mM, pH=7.4) с добавлением глиоксиловой кислоты (2%) и сахарозы (10%). Затем артерии расправляли на предметном стекле адвентицией вверх, так, чтобы длина препарата была приблизительно равной его длине в теле крысы. Далее препарат высушивали под струей теплого воздуха (30 минут) и в сушильном шкафу при температуре 100°C (5 минут). Высушенный препарат заливали вазелиновым маслом и накрывали покровным стеклом.

Препараты артерий фотографировали с помощью микроскопа Axiovert 200 с цифровой камерой AxioCam HiRes (разрешение 1300×1030 пикселей, 8 бит/пиксель) (Zeiss, Германия) при двадцатикратном увеличении. Из общего излучения источника (ртутная лампа HB0103) свет, возбуждающий люминесценцию, выделяли с помощью системы светофильтров S25. Значения длины волны возбуждающего света и исследуемой люминесценции составляли 380-440 и 440-480 нм, соответственно.

2.4 Культивирование артерий

2.4.1 Условия культивирования

Для культивирования артерий использовали CO₂-инкубатор MCO-170AIC-PE (Panasonic-Sanyo, Япония). Внутри инкубатора поддерживались температура 37°C и концентрация CO₂ 5% (остальные 95% занимал атмосферный воздух). Сегменты артерий инкубировали в 24-луночных пластиковых планшетах по отдельности, то есть каждый сегмент располагали в своей лунке.

Культивирование артерий в присутствии ингибитора 5'-дейодирования с последующей регистрацией сократительных ответов было необходимо для определения вклада D2 в T₃-зависимую регуляцию тонуса сосудов. Это предъявляло определенные требования к составу культуральной среды. В частности, в связи с этим в состав среды не должна входить фетальная сыворотка, так как она содержит T₃ и T₄, что может влиять на результаты эксперимента (Bianco et al., 2014). Кроме того, факторы роста в составе фетальной сыворотки могут вызвать частичную дедифференцировку гладкомышечных клеток, что может ослабить сократительные ответы артерий и затруднить интерпретацию полученных данных (Morita et al., 2010).

В связи с этим для культивирования использовали бессывороточную среду следующего состава: DMEM с глутамином (содержание глюкозы 4.5 г/л) и среда F12 в одинаковом соотношении, с добавлением 250 ед./мл стрептомицина и 250 ед./мл пенициллина (все реактивы – ПанЭко, Россия). Для приготовления среды и распределения ее по лункам использовали серологические пипетки. В каждую лунку добавляли по 1.5 мл среды. При культивировании в течение 48 часов среду заменяли на свежую через 24 часа после начала культивирования. Приготовление среды, манипуляции с планшетами, перенос артерий в планшеты осуществляли в стерильной зоне внутри ламинарного бокса (LamSystems, Россия). При выемке сосудов или замене среды проводили визуальный осмотр лунок на наличие бактериальной или грибковой контаминации.

2.4.2 Определение оптимального срока культивирования для оценки функциональной роли D2 в сосудах

Для успешного использования методики культивирования артерий (organ culture) с целью исследования функциональной роли D2 было необходимо определить длительность культивирования, при которой:

- не происходит выраженного снижения содержания мРНК D2 и рецепторов TR α ;
- не происходит выраженного изменения вазомоторных реакций артерий.

После декапитации задние конечности крысы помещали в чашки с полимером Sylgard, и закрепляли при помощи инъекционных игл. После этого аккуратно выделяли суральные артерии целиком (обе ветви вместе) из окружающих тканей при помощи микроножниц и тонкого пинцета в холодном (4 °C) препаровочном растворе следующего состава, mM: NaCl 145; KCl 4.5; CaCl₂ 0.1; MgSO₄ 1; NaH₂PO₄ 1.2; ЭДТА 0.025; HEPES 5 (pH = 7.4). Часть артерий сразу после выделения помещали в стабилизирующий РНК буфер RNA-later (Qiagen, Голландия), через 60 минут замораживали и хранили при температуре -20°C до проведения ПЦР-РВ (интактные артерии, не подвергавшиеся культивированию). Остальные артерии случайным образом распределяли на три группы: культивируемые в течение 8, 24 или 48 часов.

Культивирование проводили в условиях, описанных в разделе 2.4.1. Сразу после окончания культивирования препараты также помещали в стабилизирующий РНК буфер RNA-later (Qiagen, Голландия), через 60 минут замораживали и хранили при температуре -20°C до проведения ПЦР-РВ.

Влияние условий культивирования на вазомоторные реакции артерий икроножной мышцы исследовали в отдельной серии экспериментов, в которой длительность культивирования составила 12 часов (препараты помещали в CO_2 -инкубатор вечером и вынимали утром следующего дня). Затем сравнивали реакции культивированных и свежеизолированных артерий.

2.4.3 Оценка функциональной роли D2 в сосудах

Для оценки функциональной роли D2 в сосудах был выбран срок культивирования 12 часов. Определить вклад D2 в работу сосудов можно при помощи ингибитора 5'-дейодирования – реакции конверсии T_4 в T_3 , катализируемой D2 (Рис.1, таблица 1). Таким ингибитором является иопаноевая кислота (IOP) (Coppola et al., 2005).

После выделения суральные артерии случайным образом распределяли на четыре группы, которые далее культивировали в присутствии:

- 1) ДМСО (растворитель для IOP и T_4 , концентрация 0.15% об.);
- 2) IOP (100 мкМ);
- 3) T_4 (субстрат D2, 50 пМ);
- 4) T_4 +IOP (50 пМ и 100 мкМ, соответственно).

Концентрация T_4 была выбрана на уровне концентрации свободного T_4 в крови крыс (Gaynullina et al., 2017). В связи с тем, что и T_4 , и IOP были растворены в ДМСО, все группы выравнивали по содержанию ДМСО в лунках (итоговая объемная концентрация – 0.15%).

После культивирования часть артерий помещали в стабилизирующий РНК буфер RNA-later (Qiagen, Голландия), после чего замораживали и хранили при температуре -20°C до проведения ПЦР-РВ. Другую часть артерий использовали для регистрации сократительной активности в изометрическом режиме.

2.5 Регистрация сократительной активности артерий в изометрическом режиме

2.5.1 Оборудование и подготовка к эксперименту

Регистрацию сократительной активности артерий в изометрическом режиме осуществляли при помощи систем wire myograph: двух двухканальных (Dual Wire Myograph Systems – 410A и 420A) и двух четырехканальных (Multi Myograph System – 620M) (DMT,

Дания). Выделенные артерии разрезали на кольцевые сегменты длиной 2 мм и размещали их в камерах миографа на двух стальных проволоках толщиной 40 мкм (Рис. 3). Одна из проволок крепилась к головке, соединенной с микрометром, позволяющим контролируемо изменять расстояние между струнами (степень растяжения препарата). Вторая проволока крепилась к головке миографа, соединенной с тензометрическим датчиком. Показания тензометрических датчиков оцифровывали с частотой 10 Гц с использованием аналого-цифрового преобразователя E14-140 (L-CARD, Россия) и регистрировали в программе PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия).

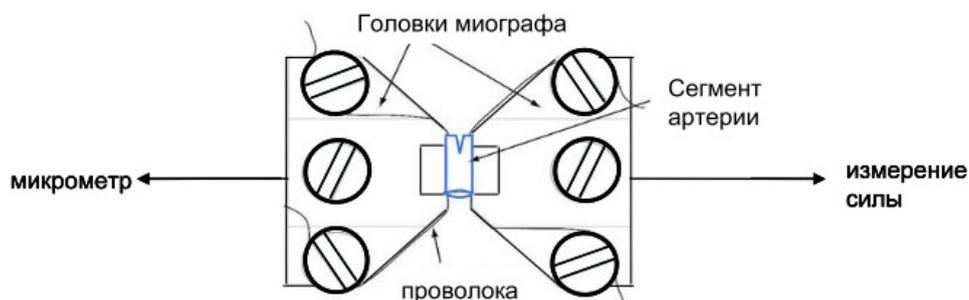


Рис. 3. Схема крепления сегмента артерии к головкам миографа.

Камера миографа имеет объем 5 мл. Во время закрепления сосуда на проволоках в камере находился холодный препаровочный раствор с низким содержанием кальция для предотвращения излишних сокращений сегмента по время этой процедуры. Препаровочный раствор имел следующий состав, мМ: NaCl 145, KCl 4.5, CaCl₂ 0.1, MgSO₄ 1, NaH₂PO₄ 1.2, ЭДТА 0.025, HEPES 5 (pH = 7.4). При необходимости, в закрепленном на проволоках сегменте сосуда механически удаляли эндотелий путем вращения крысиного уса в его просвете.

После закрепления сосуда на проволоках раствор заменяли на рабочий с содержанием кальция, близким к его физиологическому уровню. Рабочий раствор имел следующий состав, мМ: NaCl 120, NaHCO₃ 26, KCl 4.5, CaCl₂ 1.6, MgSO₄ 1, NaH₂PO₄ 1.2, D-глюкоза 5.5, ЭДТА 0.025, HEPES 5. Для поддержания pH на уровне 7.4 раствор непрерывно аэрировали карбогеном (газовая смесь 95% O₂+5% CO₂). Препараты находились в рабочем растворе на протяжении всего эксперимента, кроме процедуры нормализации (см. раздел 2.5.2).

После замены препаровочного раствора на рабочий камеру включали нагрев миографа, в течение эксперимента температура поддерживалась на уровне 37°C. После нагрева камеры переходили к процедуре нормализации.

2.5.2 Процедура определения оптимального растяжения сосуда

Процедура определения оптимального растяжения сосуда («нормализация») позволяет установить значение длины окружности кольцевого препарата артерии, при котором сила сокращения будет максимальной (Mulvany, Halpern, 1977). Кроме того, нормализация позволяет стандартизовать влияние растяжения на чувствительность препарата к воздействию вазоактивных веществ (Nilsson et al., 1986).

В ходе нормализации вычисляется пассивная эластическая характеристика кольцевого препарата, поэтому гладкая мышца артерии должна быть полностью расслаблена. В связи с этим за 5 минут до нормализации рабочий раствор в камере заменяли на нагретый бескальциевый раствор следующего состава, мМ: NaCl 120, NaHCO₃ 26, KCl 4.5, MgSO₄ 1.0, NaH₂PO₄ 1.2, D-глюкоза 5.5, EGTA 0.1, HEPES 5.0 (pH=7.4).

После закрепления сосуда проволоки оставляли сведенными, поэтому исходная сила натяжения препарата была равной нулю. После записи показания микрометра, соответствующего нулевой силе, начинали ступенчато увеличивать расстояние между проволоками с интервалом в 2 минуты. По окончании каждых 2 минут записывали показания силы, соответствующее данному расстоянию между проволоками. Вычисления проводили при помощи программы, любезно предоставленной профессором Н. Nilsson (Department of Physiology, University of Gothenburg, Sweden). Программа была расположена на сайте <http://www.holger.nu/norm/>.

Алгоритм работы программы включал:

- 1) вычисление натяжения стенки сосуда по формуле $T=F/2l$, где T – натяжение (Н/м), F – сила (мН), l – длина сегмента (мм), 2 – коэффициент, учитывающий, что в кольцевом сегменте сосуда растяжению подвергаются два слоя стенки;
- 2) вычисление значения внутренней окружности препарата $IC=\pi d+2d+2a$, где IC – внутренняя окружность, d – диаметр струн (40 мкм), a – расстояние между ними;
- 3) аппроксимацию зависимости $T=f(IC)$ уравнением экспоненты;
- 4) вычисление значения IC для точки пересечения полученной кривой с изобарой для давления 100 мм рт.ст., построенной по уравнению Лапласа ($T=P*r=(P*IC)/2\pi$, где r – внутренний радиус сосуда, P – трансмуральное давление). Полученное значение (IC_{100}) соответствовало внутренней окружности расслабленного сегмента сосуда при давлении 100 мм рт. ст.;
- 5) вычисление «нормализованного» значения внутренней окружности сосуда $IC_{0.9}$, которое равно $0.9*IC_{100}$, а также соответствующего ему показания микрометра. Было показано, что при значении внутренней окружности $IC_{0.9}$ резистивные артерии развивают максимальный сократительный ответ (Mulvany, Halpern, 1977).

После определения значения $IC_{0.9}$ изменяли расстояние между проволоками таким образом, чтобы растяжение препарата соответствовало вычисленному «нормализованному» значению. Затем заменяли бескальциевый раствор на рабочий и через 8 минут переходили к процедуре активации сегмента сосуда.

2.5.3 Процедура активации препарата и проверка функциональной активности эндотелия

Выделение артерий, процедура размещения сегмента на проволоках, а также нормализация могут приводить к снижению сократительной активности препаратов. В связи с этим необходимым этапом эксперимента является процедура выработки, или активации препарата для приведения всех сегментов артерий к стандартному функциональному состоянию. Оригинальная запись процедуры нормализации и активации препарата представлена на Рис.4.

В ходе активации к сегменту сосуда добавляли норадреналин (10 мкМ) на 5 минут, вызывая его сокращение. Затем проводили стандартную отмывку: трехкратная смена рабочего раствора, затем однократные смены через 5 минут и 10 минут, общая длительность отмывки 15 минут. Далее оценивали функциональную активность эндотелия. Для этого препарат сокращали путем добавления агониста α_1 -адренорецепторов метоксамина (МХ) в концентрации, достаточной, чтобы вызвать сокращение с амплитудой 60-70% от ответа на норадреналин (обычно 1-3 мкМ). После этого добавляли ацетилхолин (1 мкМ) на 1-2 минуты. В случае, если эндотелий был функционально активен, ацетилхолин вызывал расслабление резистивных артерий на 60% и более от уровня предсокращения. Если расслабление было меньше, это означало, что эндотелий был поврежден в ходе подготовки к эксперименту и такой сегмент нельзя использовать в анализе. При успешном удалении эндотелия усом расслабление в ответ на ацетилхолин не должно было превышать 20%. Слишком сильное механическое воздействие в ходе удаления эндотелия может привести к значительному снижению силы сокращения препарата (50% от среднего уровня в группе и ниже). Таких сегментов было менее 5%, и их не учитывали при анализе результатов. После тестирования реакции на ацетилхолин препарат отмывали и добавляли метоксамин в более высокой концентрации (10 мкМ) на 5 минут. Затем проводили отмывку, после которой приступали к основному протоколу эксперимента.

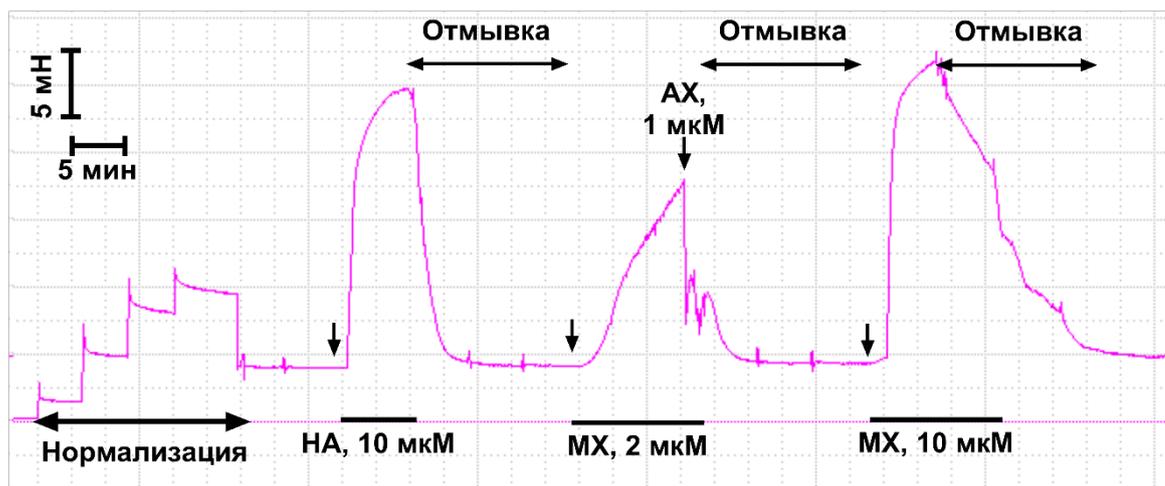


Рис.4. Оригинальная запись процедур нормализации, активации и проверки функциональной активности эндотелия в эксперименте на препарате артерии икроножной мышцы. НА – норадреналин, МХ – метоксамин, АХ – ацетилхолин. Стрелки соответствуют моментам аппликации агонистов.

В экспериментах по регистрации сократительных ответов артерий, инкубированных с ингибитором 5'-дейодирования, протокол активации препарата несколько отличался. Мы предполагали, что культивирование приведет к снижению их изначальной сократительной активности, поэтому после активации на норадреналин (10 мкМ) проводили дополнительную активацию на метоксамин (10 мкМ). Проверку функциональной целостности эндотелия не проводили, так как в этих экспериментах ее анализировали путем исследования зависимости «концентрация-эффект» на ацетилхолин (см. 2.5.6).

2.5.4 Фармакологические агенты, использованные в экспериментах на изолированных сосудах

Список фармакологических агентов, использованных во всех экспериментальных протоколах, представлен в таблице 3.

Таблица 3. Фармакологические агенты, использованные в протоколах экспериментов на изолированных сосудах.

Название	Фармакологическая активность	Производитель	Растворитель	Концентрация маточного раствора, мМ	Рабочая концентрация, мкМ	Время инкубации, мин (если применимо)	Основание для выбора концентрации блокаторов/ингибиторов
Норадреналин (битартрат моногидрат)	Агонист адренорецепторов	Sigma	H ₂ O	10	10	-	-
Ацетилхолин (хлорид)	Агонист холинорецепторов	Sigma	H ₂ O	10	0.01-1	-	-
DEA-NO (диэтиламин NONOat)	Донор NO	Sigma	0.01 M NaOH	1	0.001-10	-	-
Метоксамин (гидрохлорид)	Агонист α ₁ -адренорецепторов	Sigma	H ₂ O	10	0.01-100	-	-
N-нитро-L-аргинин (L-NNA)	Ингибитор NO-синтаз	Alexis Biochemicals	H ₂ O	10	100	20	(Gaynullina et al., 2013)
L-трийодотиронин (T ₃ , натриевая соль)	T ₃	Sigma	DMCO	10	0.03-10	20	-
L-тироксин (T ₄ , натриевая соль)	T ₄	Sigma	DMCO	10	0.03-10	20*	-

* при использовании в экспериментах с веществами, имеющими более долгое время инкубации, время инкубации увеличивали до максимального среди использованных веществ. Во всех экспериментах общий объем веществ, добавленных одновременно в камеру миографа, не превышал 150 мкл, то есть составлял не более 3%. См. продолжение на следующей странице

Таблица 3. Продолжение

Название	Фармакологическая активность	Производитель	Растворитель	Концентрация маточного раствора, мМ	Рабочая концентрация, мкМ	Время инкубации, мин (если применимо)	Основание для выбора концентрации блокаторов/ингибиторов
Иопановая кислота (IOP)	Ингибитор 5'-дейодирования	Sigma	ДМСО	100	100	30	(Coppola, Hughes 2005; Kaplan, Yaskoski, 1980)
Тетрайодотироуксусная кислота (тетрак)	Блокатор сайтов связывания тиреоидных гормонов с интегрином $\alpha\upsilon\beta 3$	Sigma	ДМСО	10	3	30	(Meng et al., 2011; Zanatta et al., 2013)
Ибериотоксин	Блокатор каналов ВК _{Ca}	Tocris	H ₂ O	0.03	0.1	20	(Shvetsova et al., 2019)
U0124	Неактивный аналог U0126	Calbiochem	ДМСО	10	10	20	-
U0126	Ингибитор киназы MEK1/2 (подавляет активацию ERK1/2)	Calbiochem	ДМСО	10	10	20	(Streefkerk et al., 2004)
Compound22	Ингибитор интегрин-связанной киназы	Calbiochem	ДМСО	10	10	30	(Lee et al., 2011)

См. продолжение на следующей странице

Таблица 3. Продолжение

Название	Фармакологическая активность	Производитель	Растворитель	Концентрация маточного раствора, мМ	Рабочая концентрация, мкМ	Время инкубации, мин (если применимо)	Основание для выбора концентрации блокаторов/ингибиторов
Ибериотоксин	Блокатор каналов VK_{Ca}	Tocris	H_2O	0.03	0.1	20	(Shvetsova et al., 2019)
U0124	Неактивный аналог U0126	Calbiochem	ДМСО	10	10	20	-
U0126	Ингибитор киназы MEK1/2 (подавляет активацию ERK1/2)	Calbiochem	ДМСО	10	10	20	(Streefkerk et al., 2004)
Compound22	Ингибитор интегрин-связанной киназы	Calbiochem	ДМСО	10	10	30	(Lee et al., 2011)
PP3	Неактивный аналог PP2	ApexBio	ДМСО	10	10	20	-
PP2	Ингибитор Src-киназы	ApexBio	ДМСО	10	10	20	(Zavaritskaya et al., 2017)
Y27632	Ингибитор Rho-киназы	Tocris	H_2O	10	3	20	(Gaynullina et al., 2018)

Выбор концентраций блокаторов и ингибиторов был основан на данных литературы, источники указаны в таблице 3. Кроме того, для веществ, которые, насколько нам известно, были впервые использованы в экспериментах по регистрации сократительных ответов артерий (тетрайодотируоксусная кислота и compound22), мы также проводили предварительные эксперименты с использованием разных рабочих концентраций (1, 3 и 10 мкМ для тетрайодотируоксусной кислоты, 1 и 10 мкМ для compound22), чтобы оценить их собственное влияние на вызванное метоксамином сокращение, а также на вызванное тиреоидными гормонами расслабление.

2.5.5 Протокол эксперимента по исследованию влияния 12-часового культивирования на сократительные ответы артерий

Для сравнения сократительных ответов интактных и культивированных в течение 12 часов артерий (см. 2.4.2) после активации препаратов проводили зависимость «концентрация-эффект» на метоксамин. При этом в камеру миографа кумулятивно добавляли метоксамин в возрастающих концентрациях; итоговые концентрации метоксамина в камере составляли: 0.01, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 мкМ. Интервал между добавлениями был равным 3 мин в области более низких концентраций (0.01 – 3 мкМ) и 2 мин в области более высоких (начиная с 10 мкМ).

Для исследования функциональности эндотелия артерии предсокращали метоксамином в относительно низкой концентрации (1-3 мкМ), после выхода сокращения на плато кумулятивно повышали концентрацию ацетилхолина в растворе с интервалом в 1 минуту; итоговые концентрации ацетилхолина составляли 0.01, 0.1 и 1 мкМ.

2.5.6 Протокол эксперимента по исследованию влияния ингибитора 5'-дейодирования на реакции сокращения и расслабления артерий

Для исследования влияния ингибитора 5'-дейодирования на сократительную активность артерий использовали сегменты, культивированные в присутствии ДМСО, IOP, T₄ и T₄+IOP (см. 2.4.3).

Через 20 минут после процедуры активации артерии сокращали метоксамином (10 мкМ), после выхода реакции на плато проводили зависимость «концентрация-эффект» на ацетилхолин путем кумулятивного повышения концентрации ацетилхолина с односторонними интервалами; итоговые концентрации ацетилхолина в растворе: 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 мкМ. После этого проводили стандартную отмывку (см. 2.5.3).

Далее проводили зависимость «концентрация-эффект» на метоксамин (концентрации 0.01, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 мкМ, добавления с интервалами 2 или 3 мин, подробнее см. 2.5.5).

После стандартной отмывки сегменты инкубировали с L-NNA (100 мкМ) в течение 20 минут, затем повторяли зависимость «концентрация-эффект» на ацетилхолин. После отмывки еще раз инкубировали с L-NNA (100 мкМ, 20 минут) и повторяли зависимость «концентрация-эффект» на метоксамин.

После отмывки проводили последнюю 20-минутную инкубацию с L-NNA (100 мкМ), а после нее - зависимость «концентрация-эффект» на донор NO DEA-NO путем кумулятивного повышения концентрации DEA-NO с трехминутными интервалами; итоговые концентрации DEA-NO в камере составили 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 и 10 мкМ. Использование L-NNA при исследовании реакций на DEA-NO было необходимо для исключения наложения эффектов экзогенного и эндогенного NO.

2.5.7 Протокол эксперимента по исследованию быстрого расслабления артерий под действием T₃ и T₄

Чтобы удостовериться, что все используемые в эксперименте сегменты сопоставимы по функциональному состоянию (обладают сходной чувствительностью к констрикторным влияниям и максимальной сократимостью), сначала проводили зависимость «концентрация-эффект» на метоксамин (как описано в 2.5.5). Затем для исследования быстрого расслабления артерий под действием тиреоидных гормонов сегменты сокращали метоксамином до 60-70% от максимума, наблюдаемого в опыте. После добавления метоксамина ждали около семи минут. Если артерия поддерживала стабильное сокращение, через еще три минуты начинали проводить зависимость «концентрация-эффект» на T₃ или T₄, в камеры с артериями контрольной группы добавляли растворитель (ДМСО) в таком же объеме. В случае, если в течение семи минут после добавления метоксамина происходило значительное (более 10%) снижение тонуса артерии, концентрацию метоксамина в камере увеличивали и повторно ждали стабилизации ответов. Такой подход был необходим, чтобы минимизировать спонтанное расслабление артерий (спонтанный спад тонуса) во время зависимости «концентрация-эффект» на гормоны.

В ходе зависимости «концентрация-эффект» на тиреоидные гормоны в камеру с сосудами добавляли T₃/T₄ в кумулятивно увеличивающихся концентрациях или эквивалентные объемы ДМСО с 10-минутными интервалами. 10-минутный интервал был выбран, исходя из данных, что при действии по негеномному механизму T₃ способен значительно изменять фосфорилирование eNOS уже после пятиминутной инкубации (Hiroi et al., 2006). Итоговые концентрации гормонов в камере миографа составляли: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 мкМ.

В части экспериментов перед зависимостью «концентрация-эффект» на тиреоидные гормоны сегменты в течение 30 минут инкубировали с ИОР (100 мкМ) или эквивалентным объемом ДМСО.

Объемная концентрация ДМСО во всех экспериментах по данному протоколу не превышала 0.7%.

2.5.8 Протокол эксперимента по исследованию быстрых эффектов Т₃ и Т₄ на сократительные ответы артерий

Для исследования быстрых эффектов Т₃ и Т₄ на развитие сократительных ответов использовали протокол с двумя последовательными зависимостями «концентрация-эффект» на метоксамин. Зависимости проводили как описано в 2.5.5.

Между двумя зависимостями «концентрация-эффект» сегменты инкубировали с 10 мкМ Т₄ или Т₃, с различными ингибиторами или блокаторами (табл. 3) или в присутствии комбинации Т₄ или Т₃ с фармакологическими агентами. Время инкубации составляло 20 или 30 мин, в зависимости от используемого фармакологического агента (табл. 3). Так как Т₃, Т₄ и часть ингибиторов были разведены в ДМСО, мы дополнительно добавляли ДМСО в некоторые каналы, чтобы его содержание во всех каналах в эксперименте было одинаковым. Объемная концентрация ДМСО во всех экспериментах по данному протоколу не превышала 0.4%. Пример оригинальных записей для сегментов, инкубированных в присутствии ДМСО и Т₄, представлен на Рис.5.

Первая зависимость «концентрация-эффект» на метоксамин позволяла убедиться в том, что изначально все сегменты обладают сходной реактивностью на метоксамин. Во всех сериях экспериментов, проведенных по данному протоколу, не было обнаружено отличий первых зависимостей между группами. Таким образом, отличия, которые наблюдались между группами после второй зависимости, были обусловлены влиянием использованных фармакологических агентов. На графиках с результатами экспериментов по данному протоколу представлены именно вторые зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин.

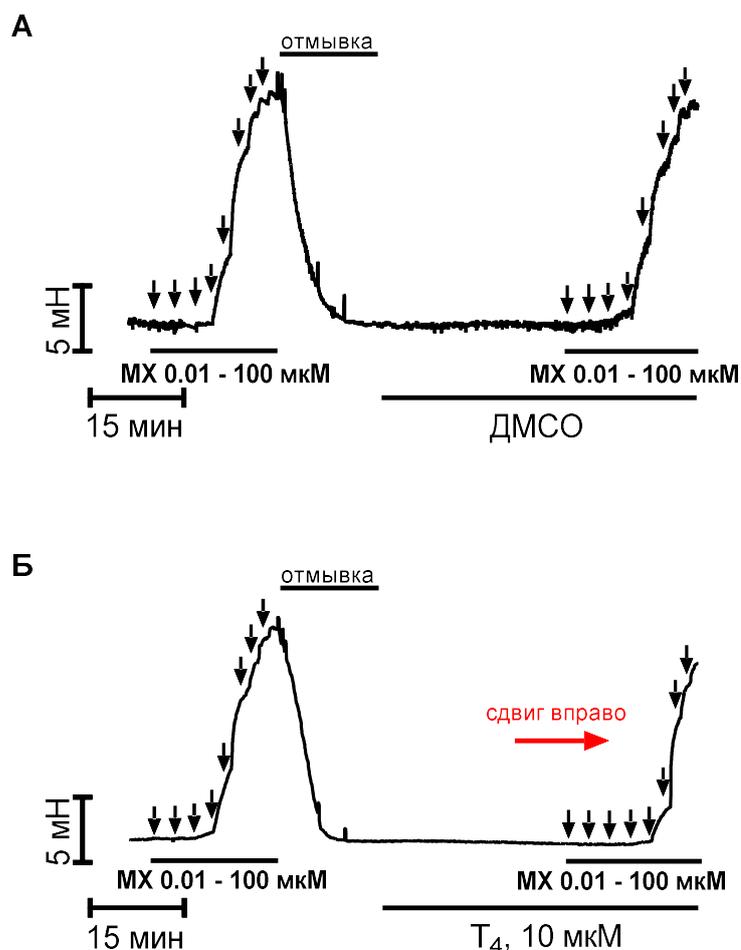


Рис.5. Оригинальная запись эксперимента по исследованию быстрых эффектов тиреоидных гормонов на сократительные ответы артерий (протокол с двумя последовательными зависимостями «концентрация-эффект» на метоксамин) с инкубацией препаратов с ДМСО (А) или Т₄ (Б). Инкубация с Т₄ приводит к ослаблению сократительных ответов артерии на метоксамин (сдвигу второй зависимости вправо). МХ – метоксамин. Стрелки соответствуют аппликациям метоксамина.

2.5.9 Обработка результатов

При обработке результатов использовали программное обеспечение PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия) и GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.).

При анализе зависимостей «концентрация-эффект» определяли значения силы для каждой концентрации агониста. Для зависимостей на метоксамин усредняли значение силы за 20 с на максимуме эффекта. Для зависимостей на ацетилхолин, DEA-NO и тиреоидные гормоны усредняли значение силы за все время действия концентрации (1, 3 и 10 мин, соответственно). Из полученных значений силы вычитали значение пассивной силы (минимальное значение силы, зарегистрированное в данном эксперименте, обычно

соответствовало значению силы сразу после нормализации сосуда). Полученные значения активной силы выражали в процентах от максимального значения в первой зависимости «концентрация-эффект» (для метоксамина) или от уровня предсокращения сосуда (для ацетилхолина, DEA-NO и тиреоидных гормонов). На итоговых графиках представлены средние значения в процентах.

Для части экспериментов было необходимо оценить чувствительность артерий к метоксамину. Для реакций, описывающихся сигмоидальной зависимостью от концентрации агониста, в качестве показателя чувствительности традиционно используют параметр EC₅₀, соответствующий концентрации метоксамина, вызывающей полумаксимальную реакцию. Для вычисления EC₅₀ каждую зависимость «концентрация-эффект» на метоксамин аппроксимировали уравнением $Y = \frac{Y_{Min} + (Y_{Max} - Y_{Min})}{1 + 10^{(\log EC_{50} - X) \times HillSlope}}$, где Y – величина реакции при концентрации агониста X, Y_{Min} и Y_{Max} – минимальная и максимальная реакции на агонист X, HillSlope – коэффициент Хилла, определяющий крутизну кривой. Вычисления проводили с помощью программы GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., США).

Чтобы оценить выраженность вызванного T₃ или T₄ подавления сократительных ответов на метоксамин, вычисляли относительное изменение площади под кривой (AUC). Вычисления проводили с помощью программы GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., США). Значение AUC во второй зависимости «концентрация-эффект» для каждого препарата выражали в процентах от среднего значения AUC во второй зависимости «концентрация-эффект» в соответствующей контрольной группе.

2.6 Определение уровня мРНК в тканях методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

2.6.1 Выделение РНК и проведение обратной транскрипции

Набор материала для ПЦР-РВ осуществляли стандартным образом. Один образец содержал либо одну суральную артерию целиком (медиальную и латеральную ветви), либо три артерии брыжейки 2-3 порядка ветвления от одной крысы. Таким образом, число образцов всегда совпадало с числом крыс в выборке.

Выделение суммарной РНК из сосудов осуществляли при помощи набора CleanRNA Standard (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя с использованием буфера RLT (Qiagen, Голландия). Гомогенизацию сосудов осуществляли на льду при помощи пластиковых пестиков (Qiagen, Голландия), вставленных в патрон шуруповерта. Одновременно (в один заход) проводили гомогенизацию не более 6 образцов. После выделения образцы обрабатывали

ДНКазой I (ThermoScientific, США) в присутствии буфера для ДНК-азы с $MgCl_2$ (ThermoScientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. От полученных проб отбирали 2 мкл для измерения концентрации РНК и определения отношений $A_{260}/_{230}$ и $A_{260}/_{280}$ в спектрофотометре Nanodrop 1000 (ThermoScientific, США). Если значение отношений $A_{260}/_{230}$, $A_{260}/_{280}$ выходило за пределы диапазона 1.8 – 2.2, это было основанием для исключения образца из анализа. После измерения концентрации суммарной РНК все образцы приводили к единой концентрации для внесения одинакового объема РНК в реакцию обратной транскрипции. В разных сериях итоговая концентрация суммарной РНК составляла от 15 до 25 нг/мкл.

Синтез кДНК проводили с помощью набора MMLV RV kit (Евроген, Россия) по инструкции производителя. Синтезированную кДНК хранили при $-20^{\circ}C$, а оставшиеся образцы суммарной РНК – в кельвинаторе при $-80^{\circ}C$.

2.6.2 Проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени

ПЦР-РВ проводили с помощью наборов qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) с интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBR Green I в соответствии с инструкцией производителя. Исследованные в работе гены и использованные праймеры перечислены в таблице 4; праймеры были синтезированы в фирме Евроген (Россия).

Нужно отметить, что в разных сериях экспериментов проводили анализ экспрессии мРНК разного набора генов в соответствии с поставленными задачами. В разных сериях в качестве референсных были использованы разные гены: в серии с моделью гипертиреоза - *Gapdh* и *Actb*, в серии с хронической десимпатизацией – *Rn18s*, в серии с хроническим подавлением синтеза NO – *Rplp0*. Для культивированных сосудов референсным геном был *Actb*. Экспрессия этих генов между сравниваемыми группами не отличалась. При использовании более одного референсного гена экспрессию генов интереса нормировали на среднее геометрическое значений для референсных генов.

Протокол амплификации состоял из денатурации кДНК при температуре $95^{\circ}C$ в течение 10 минут, 40 циклов (30 сек $95^{\circ}C$, 30 сек $60^{\circ}C$, 60 сек $72^{\circ}C$) и 10 минут при $72^{\circ}C$.

Значения эффективности праймеров определяли методом последовательных разведений в предварительных экспериментах, а также по нарастанию интенсивности флуоресценции в программе LinRegPCR (Ruijter et al., 2009) непосредственно в ходе анализа экспрессии генов в опытных образцах. Для всех исследованных генов значения эффективности праймеров находились в диапазоне 1.8-2.09.

Таблица 4. Исследованные гены, последовательности праймеров и значения эффективности реакции, определенные методом последовательных разведений.

Название гена	Белок	Последовательность праймеров (5' – 3')	Эффективность
<i>Rn18s</i>	18S РНК	Прямой: CACGGGTGACGGGGAATCAG Обратный: CGGGTCTGGGAGTGGGTAATTTG	1.95
<i>Rplp0</i>	RPLP0	Прямой: AGGGTCCTGGCTTTGTCTGTGG Обратный: AGCTGCAGGAGCAGCAGTGG	1.95
<i>Gapdh</i>	GAPDH	Прямой: CCATCAAGGACCCCTTCATT Обратный: CACCAGCATCACCCCATTT	2
<i>Acta2</i>	α -актин	Прямой: CCTGACCCTGAAGTATCCGA Обратный: CATCTCCAGAGTCCAGCACA	2.01
<i>Actb</i>	β -актин	Прямой: CAGGGTGTGATGGTGGGTATGG Обратный: AGTTGGTGACAATGCCGTGTTC	2.09
<i>Dio2</i>	D2	Прямой: GCGACCTGACCACCTTTTACTAG Обратный: GCAGCACATCGGTCCTCTTG	1.8
<i>Thra</i>	TR α_1	Прямой: TGCCCTTACTCACCCCTACA Обратный: AAGCCAAGCCAAGCTGTCTT	2.02
<i>Thra</i>	TR α_2	Прямой: TGAGCAGCAGTTTGGTGAAG Обратный: GAATGGAGAATTCCGCTTCG	1.97
<i>Nos3</i>	eNOS	Прямой: GGATTCTGGCAAGACCGATTAC Обратный: GGTGAGGACTTGTCCAAACACT	1.84
<i>Nos1</i>	nNOS	Прямой: GCCATCCAGCGCATAATGACCCAG Обратный: GAGGGTGA CTCCAAAGATGTCCTC	1.95
<i>Nos2</i>	iNOS	Прямой: AGGCTTGGGTCTTGTTAGCCTAGT Обратный: ATTCTGTGCAGTCCCAGTGAGGAA	2
<i>Arg2</i>	Arg2	Прямой: CCAGCCTAGCAGTGGATGTGA Обратный: CTCTGGAATGCTGTTCGTGAA	1.84
<i>Atp2a2</i>	Serca2	Прямой: CGAGTTGAACCTTCCCACAA Обратный: AGGAGATGAGGTAGCGGATGAA	1.99
<i>Ryr2</i>	RyR2	Прямой: GAGAGCCCGGAAGCTCTGAA Обратный: GGCAACTCCATGGCACACAC	1.99
<i>Nox1</i>	NOX1	Прямой: CGTCACTCCCTTTGCTTCCT Обратный: AGGCACCCGTCTCTTACAA	1.84

2.6.3 Обработка результатов

Уровень экспрессии генов определяли с использованием программного обеспечения RotorGene6000. Содержание мРНК в образцах 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. Затем значения усредняли внутри каждой экспериментальной группы и выражали в процентах от среднего значения в контрольной группе.

2.7 Определение уровня белка в тканях методом Вестерн блот

Методику Вестерн блот использовали для:

- 1) определения относительного содержания белка D2 в артериях крыс с экспериментальным гипертиреозом, хронически десимпатизированных и с подавленным синтезом NO в организме, а также контрольных к ним крыс;
- 2) определения относительного содержания фосфорилированных форм белков – потенциально задействованных при негеномном действии T_4 на артерии икроножной мышцы.

2.7.1 Подготовка образцов артерий для определения содержания фосфорилированных форм белков

Известно, что в ходе негеномного действия тиреоидные гормоны могут изменять уровень фосфорилирования белков (Cao et al., 2005; Hiroi et al., 2006; Samuel et al., 2017). В наших экспериментах эффект T_4 наблюдался только в присутствии метоксамина, в этом случае T_4 подавлял вызванные метоксамином сократительные ответы артерий. Наиболее выраженный эффект T_4 наблюдался в середине диапазона использованных концентраций метоксамина: при 3 и 10 мкМ. В связи с этим влияние T_4 на фосфорилирование белков исследовали в артериях, активированных метоксамином в концентрации 10 мкМ.

Суральные артерии подвергали тем же манипуляциям, что и в экспериментах по регистрации сократительных ответов. Для этого была использована специально разработанная система-аналог миографа. Сегменты артерий икроножной мышцы длиной 10 мм размещали на проволоках в аналоге миографа, после чего проволоки ступенчато раздвигали, пока внутренний диаметр не достигал среднего значения IC_{100} , определенного по полученным ранее данным нормализации для суральной артерии крыс с такой же массой тела (см. 2.5.2). Затем уменьшали растяжение артерий до определенного аналогичным образом среднего значения $0.9 \cdot IC_{100}$ и

проводили стандартную активацию, как описано в 2.5.3. После этого часть артерий в течение 20 минут инкубировали с ДМСО, а часть – с T₄. Далее проводили зависимость «концентрация-эффект» на метоксамин до концентрации 10 мкМ (к части препаратов, инкубированных с ДМСО, вместо метоксамина добавляли эквивалентный объем H₂O). Через 2 минуты после добавления последней концентрации метоксамина головки миографа вместе с закрепленным на них препаратом быстро перемещали в пробирку с 1 мл 15% раствора треххлоруксусной кислоты в ацетоне, охлажденного на сухом льду. Затем перерезали проволоки и оставляли артерии в этом растворе на 3 ч. Далее артерии перемещали на 1 час в пробирку с 1 мл охлажденного на сухом льду ацетона, после чего переносили в пустые открытые пробирки, также стоящие на сухом льду, и высушивали в течение 15-25 минут. Критерием полного высыхания было приобретение образцом белой окраски. После высушивания пробирки закрывали и артерии хранили в кельвинаторе при -70°C до проведения гомогенизации.

Для увеличения количества материала в одном образце объединяли два 10-мм сегмента артерии икроножной мышцы (из двух задних конечностей) от одной крысы, подвергнутые одинаковым воздействиям. Наряду с образцами артерий икроножной мышцы, были получены два образца, каждый из которых включал пять артерий брыжейки 2-3 порядка ветвления. Артерии брыжейки помещали в камеры миографа с препаратами артерий икроножной мышцы и вместе с ними инкубировали с ДМСО, а затем подвергали влиянию либо метоксамина, либо растворителя (H₂O). Эти образцы замораживали и фиксировали так же, как и образцы артерий икроножной мышцы. Впоследствии их использовали в качестве образцов сравнения.

2.7.2 Гомогенизация образцов

Для гомогенизации использовали буфер следующего состава: 0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 2.5% додецилсульфата натрия (SDS), 10% глицерол, 2.47% дитиотреитол. К данному буферу добавляли ингибиторы протеаз (апротинин (50 мкг/мл), лейпептин (100 мкг/мл), пепстатин (30 мкг/мл)) и ингибиторы фосфатаз (NaF (2.1 мг/мл) и Na₃VO₄ (180 мкг/мл), все реактивы – Sigma, США). Образцы артерий гомогенизировали пластиковыми пестиками, вставленными в патрон шуруповерта, на льду в 70 мкл буфера. В один заход гомогенизировали не более 6 образцов. Затем образцы центрифугировали 5 минут при 18000 об/мин (16900 g) и +4°C. Супернатант отбирали и добавляли к нему 2 мкл бромфенолового синего. Полученные пробы хранили при температуре -20°C до проведения электрофореза.

2.7.3 Разделение белков методом гель-электрофореза и электроперенос

Для разделения белков использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS (по Лемли). На одну из дорожек наносили цветные белковые маркеры

(Prestained Protein Ladder – Mid-range molecular weight (10 – 180 кДа, ab116027, Abcam, Великобритания). Электрофорез проводили в приборе Bio-Rad (США) при 20 мА/гель в течение 1 часа. Состав электродного буфера был следующим: 0.025 М трис-НСl, 0.192 М глицин, 0.1% SDS.

Сразу после завершения электрофореза проводили процедуру полусухого электропереноса белков на нитроцеллюлозную мембрану в приборе Trans-Blot фирмы Bio-Rad (США) при 2.5 А в течение 30 мин. Состав буфера для электропереноса был следующим: 0.025 М трис-НСl, 0.192 М глицин, 9.6% этанол. Далее мембраны помещали в раствор Ronseau S (0.1% раствор в 0.1% уксусной кислоте), неспецифически окрашивающий белки. Данная процедура позволяла убедиться, что электроперенос прошел успешно. В ряде случаев окрашенные Ronseau S мембраны фотографировали с использованием прибора ChemiDoc (Bio-Rad, США). Ориентируясь на визуализированные полосы белков и молекулярную массу цветных маркеров, мембрану разрезали на части, которые содержали белки интереса. В экспериментах по исследованию регуляции экспрессии D2 мембраны разрезали на две части между маркерами с молекулярной массой 28 кДа и 35 кДа. Нижнюю часть мембраны использовали для определения D2, верхнюю – глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (GAPDH). В экспериментах по определению фосфорилированных форм белков в артериях для выявления мишеней быстрого действия тиреоидных гормонов мембрану разрезали на четыре части на уровне маркеров 28, 48 и 75 кДа. Далее части мембран инкубировали, как описано в 2.7.4 (перечисление снизу вверх, т.е. от меньшей молекулярной массы белков к большей):

- 1) с антителами к фосфорилированным регуляторным легким цепям миозина (pMLC2, Ser 19);
- 2) с антителами к β -актину;
- 3) с антителами к фосфорилированной протеинкиназе Akt (pAkt, Ser473);
- 4) с антителами к фосфорилированной регуляторной субъединице фосфатазы легких цепей миозина MYPT1 (pMYPT1, Thr850) (табл. 5)

2.7.4 Детекция белков на мембранах с помощью антител

%Для предотвращения неспецифического связывания антител мембраны в течение часа инкубировали в 5% обезжиренном молоке (Sigma, США), разведенном в TBSt буфере (20 мМ трис-НСl (рН 7.6), 150 мМ NaCl, 0.1% Tween 20).

Далее мембраны инкубировали 16-18 ч с первичными антителами при температуре +4°C. Список использованных первичных антител, а также разведение и состав раствора приведены в таблице 5.

Таблица 5. Список исследованных белков, характеристики специфичных к ним первичных антител и условия инкубации.

Название белка-мишени	Молекулярная масса мишени, кДа	Разведение	Состав раствора для антител	Производитель	Соответствующие вторичные антитела
D2	31	1:1000	5% обезжиренное молоко в TBSt	Abcam	Antirabbit
GAPDH	36	1:2000	5% обезжиренное молоко в TBSt	Созданы на каф. биохимии МГУ	Antimouse
β -актин	42	1:2000	5% обезжиренное молоко в TBSt	Cell Signaling	Antirabbit
pMLC2 (Ser19)	20	1:1000	5% обезжиренное молоко в TBSt	Cell Signaling	Antimouse
pAkt (Ser473)	57	1:1000	Фосфатно-солевой буфер	Cell Signaling	Antirabbit
pMYPT1 (Thr850)	130	1:1000	5% обезжиренное молоко в TBSt	Merck	Antirabbit

По завершении инкубации мембраны отмывали в TBSt буфере (3 раза по 5 минут). Затем готовили раствор соответствующих вторичных антител (см. табл. 5) в 5% обезжиренном молоке в TBSt, заливали им части мембран и инкубировали при комнатной температуре в течение 50 минут. Вторичные антитела выбирали, исходя из видовой принадлежности первичных антител. В данной работе использовали меченые пероксидазой хрена вторичные антитела antimouse (1:5000, Cell Signaling, США) и antirabbit (1:10000, Cell Signaling, США). Затем мембрану трижды отмывали по 5 минут в TBSt и переходили к проявке.

2.7.5 Детекция вторичных антител и обработка результатов

Для детекции вторичных антител на мембране (проявки сигнала) использовали раствор Femto ECL (Thermo Scientific, США), разведенный в 10 или в 100 раз в TBSt. Выбор разведения

зависел от интенсивности окрашивания мембраны. Сначала использовали менее концентрированный раствор, при необходимости увеличивали концентрацию.

Хемилюминесцентный сигнал регистрировали в системе гель-документирования ChemiDoc (Bio-Rad, США). Данный прибор позволяет делать серию снимков мембраны с частотой, заданной пользователем, по мере увеличения экспозиции ECL. Регистрацию сигнала и первичную обработку результатов проводили в программе ImageLab Software (Bio-Rad, США).

Уровень флуоресценции нормировали на сигнал GAPDH или β -актина в том же образце (на другой части мембраны). При исследовании экспрессии D2 в экспериментах с хроническим подавлением синтеза NO для нормирования использовали уровень окрашивания мембраны Ронсеау, так как это считается одним из возможных способов определения уровня загрузки дорожек белком (Romero-Calvo et al., 2010).

В экспериментах на артериях крыс с экспериментальными моделями патологий полученные значения усредняли в рамках каждой экспериментальной группы и выражали в процентах от среднего в контрольной группе. Для образцов артерий, в которых исследовали содержание фосфорилированных форм белков, нормированные на содержание β -актина значения выражали в процентах от среднего значения для двух образцов сравнения (брыжеечные артерии); эти образцы сравнения были нанесены на каждый гель.

2.8 Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.). Соответствие распределения значений нормальному проверяли при помощи теста Шапиро-Уилка. Сравнение зависимостей «концентрация-эффект» и динамики массы тела проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) и рекомендуемого программой апостериорного анализа. Сравнение прочих параметров при наличии только двух групп проводили с использованием непарного критерия Стьюдента, если выборки были распределены нормально, или при помощи критерия Манна-Уитни, если распределение отличалось от нормального. При сравнении более двух групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) и соответствующий апостериорный анализ (поправка на множественные сравнения). Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0.05$. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего; n – количество животных в группе.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Результаты исследования механизмов регуляции экспрессии дейодиназы 2 типа в артериях *in vivo*

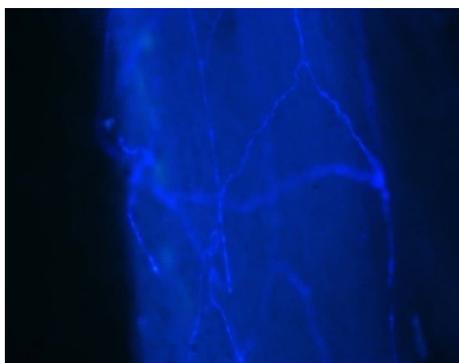
Для комплексного исследования механизмов регуляции экспрессии дейодиназы 2 типа в сосудистой системе *in vivo* были выбраны резистивные артерии двух разных сосудистых регионов: скелетных мышц (артерия, питающая икроножную мышцу, или суральная артерия) и тонкого кишечника (мелкие артерии брыжейки, 2-3 порядок ветвления верхней брыжеечной артерии). Такой подход позволил нам провести анализ тиреоидной регуляции с учетом особенностей данных сосудистых регионов, в частности плотности симпатической иннервации, продукции оксида азота, содержания дейодиназы D2 и ядерных рецепторов тиреоидных гормонов. Изменение экспрессии D2 оценивали в артериях животных с экспериментальными моделями различных патологических состояний.

3.1.1 Сравнение характеристик артерий икроножной мышцы и тонкого кишечника

Мы провели сравнение артерий двух типов по морфологическим параметрам, а также по уровню экспрессии потенциально значимых для регуляции уровня D2 генов.

Внутренний диаметр суральной артерии был меньше, чем артерий брыжейки: 288 ± 13 и 362 ± 26 мкм, соответственно (значения диаметра, вычисленные при нормализации и соответствующие давлению 100 мм рт.ст., $n=6,6$; $p < 0.05$, непарный критерий Стьюдента). Плотность сплетения адренергических волокон в стенке артерий икроножной мышцы была ниже, чем в стенке артерий брыжейки (Рис.6).

А



Б

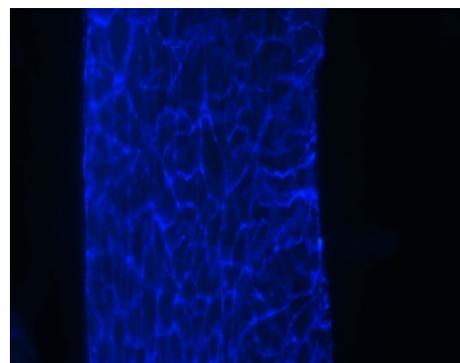


Рис.6. Сплетение адренергических волокон в стенке артерий крысы (визуализация с использованием глиоксиловой кислоты). А – артерия икроножной мышцы, Б – артерия брыжейки. Увеличение 20.

В качестве показателей, характеризующих процессы локального синтеза и рецепции тиреоидных гормонов в двух типах артерий, определяли содержание мРНК генов *D2* и рецепторов $TR\alpha$ (Рис.7). Содержание мРНК гена *D2* в артерии икроножной мышцы было выше (Рис.7А), а уровень экспрессии обеих изоформ рецепторов тиреоидных гормонов (Рис.7Б,В) - ниже, чем в артериях брыжейки. Нужно отметить, что изоформа рецептора $TR\alpha 2$ не имеет гормон-связывающего домена, то есть является нефункциональной и может лимитировать интенсивность действия тиреоидных гормонов за счет конкуренции с $TR\alpha 1$ за тиреоид-чувствительные элементы ДНК (Wills et al., 1991). В связи с этим, по мнению ряда авторов, соотношение изоформ ядерных рецепторов $TR\alpha 1/TR\alpha 2$ может служить показателем чувствительности ткани к тиреоидному влиянию (Mochizuki et al., 2007; Thijssen-Timmer et al., 2006). Вычисленное соотношение $TR\alpha 1/TR\alpha 2$ было несколько выше в артериях икроножной мышцы по сравнению с артериями брыжейки: оно составило 0.74 ± 0.05 и 0.54 ± 0.06 , соответственно ($p < 0.05$, непарный критерий Стьюдента). Таким образом, несмотря на сниженный уровень экспрессии $TR\alpha 1$ в артериях икроножной мышцы, можно полагать, что чувствительность данного типа артерий к тиреоидным гормонам может быть сходной с чувствительностью артерий тонкого кишечника за счет сниженной экспрессии нефункциональной изоформы.

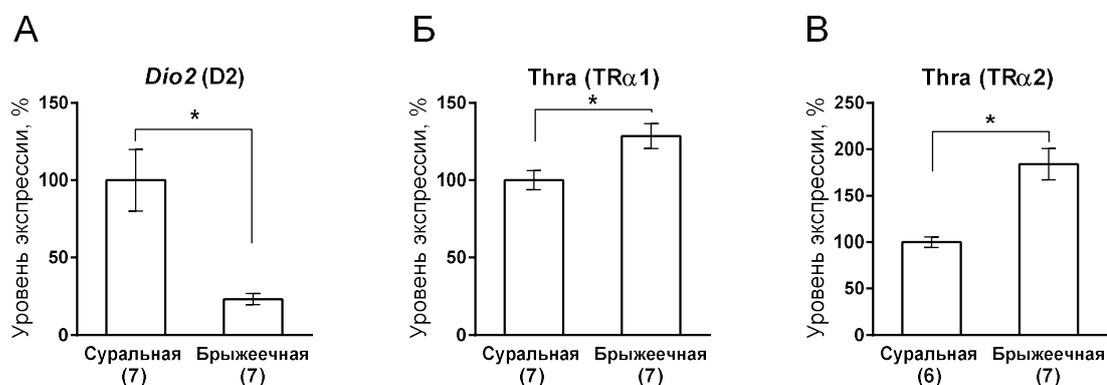


Рис.7. Относительное содержание мРНК дейодиназы 2 типа и ядерных рецепторов тиреоидных гормонов в артериях икроножной мышцы и тонкого кишечника крысы. Над диаграммами приведены названия генов и кодируемых ими белков. Данные нормированы на уровень экспрессии *Rplp0* и представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. Средний уровень экспрессии гена в суральных артериях принят за 100%. * - $p < 0.05$ (непарный критерий Стьюдента). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

Поскольку одной из задач данной работы было исследовать влияние хронического подавления синтеза оксида азота на экспрессию D2, было проведено сравнение уровней экспрессии синтаз оксида азота в двух типах артерий (Рис.8). Экспрессия eNOS (наиболее функционально важной изоформы NO-синтаз) была выше в артериях тонкого кишечника, чем в артериях икроножной мышцы (Рис.8А), содержание мРНК нейрональной и индуцибельной изоформ в двух типах артерий не отличалось (Рис.8Б,В).

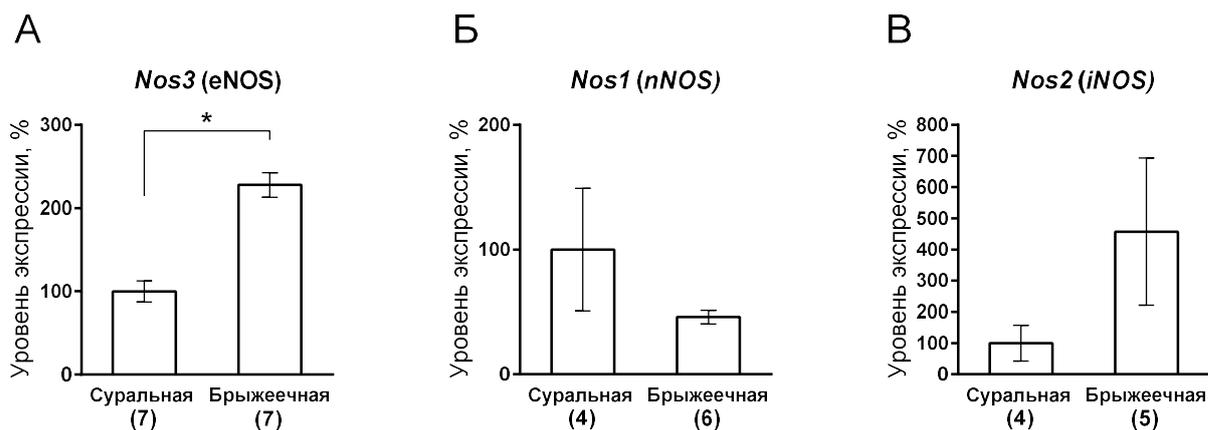


Рис.8. Относительное содержание мРНК NO-синтаз в артериях икроножной мышцы и тонкого кишечника крысы. Над диаграммами приведены названия генов и кодируемых ими белков. Средний уровень экспрессии гена в суральных артериях принят за 100%. Данные нормированы на уровень экспрессии *Rplp0* и представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * - $p < 0.05$ (непарный критерий Стьюдента). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

В связи с тем, что в артериях икроножной мышцы было обнаружено более высокое содержание мРНК D2, чем в артериях тонкого кишечника, далее в большей части исследований использовали именно артерию икроножной мышцы, так как высокий уровень экспрессии D2 может обеспечивать более широкий диапазон его изменения в ответ на различные факторы. Артерию тонкого кишечника использовали только в тех экспериментальных моделях, где учитывали влияние плотности симпатической иннервации и уровня продукции оксида азота на экспрессию D2.

3.1.2 Влияние хронического гипертиреоза на экспрессию дейодиназы 2 типа в артериях икроножной мышцы

Для исследования влияния тиреоидного статуса на экспрессию D2 в артериях была использована экспериментальная модель гипертиреоза (п/к введение T_3 в дозе 300 мкг/кг через

сутки). Для верификации состояния гипертиреоза проводили измерение тиреоидных гормонов в сыворотке крови (табл.6). Введение T₃ приводило к значимому увеличению как общего, так и свободного T₃ в крови, тогда как общий и свободный T₄ значимо снижались. Таким образом, используемая модель гипертиреоза позволяла оценить влияние избытка T₃ на фоне недостатка T₄ на тиреоидную регуляцию сосудов, то есть разделить эффекты двух форм тиреоидных гормонов на экспрессию D2.

Таблица 6. Содержание тиреоидных гормонов в сыворотке крови крыс в экспериментальных моделях различных патологических состояний.

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)
Общий T ₄ , нМ	106.3±4.6	19.5±1.4*	87.7±4.0	75.1±8.1	96.0±3.9	89.5±7.4
Свободный T ₄ , пМ	41.2±1.3	11.6±0.8*	35.9±2.0	33.1±2.4	25.6±1.3	25.8±2.0
Общий T ₃ , нМ	5.5±0.6	12.2±1.3*	5.4±0.3	4.6±0.1*	3.0±0.1	3.5±0.2
Свободный T ₃ , пМ	13.4±2.0	33.6±4.7*	11.4±0.6	9.8±0.9	8.7±0.9	8.2±1.1

Вариабельность концентрации тиреоидных гормонов в крови крыс трех контрольных групп, вероятно, связана с проведением экспериментальных серий в разное время года и, как следствие, при немного отличающейся среднесуточной температуре в помещении (21-22°C в зимний период и 23-24°C – в летний). Известно, что содержание тиреоидных гормонов в крови подвержено сезонным изменениям (Ahlerová et al., 1991) и зависит от температуры окружающей среды (Vezyraki et al., 2000). Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * - p<0.05 по сравнению с соответствующей контрольной группой (непарный критерий Стьюдента).

Гипертиреоз приводил к замедлению прироста массы тела крыс (Рис.9А). При гипертиреозе также наблюдалось увеличение систолического артериального давления (Рис.9Б).

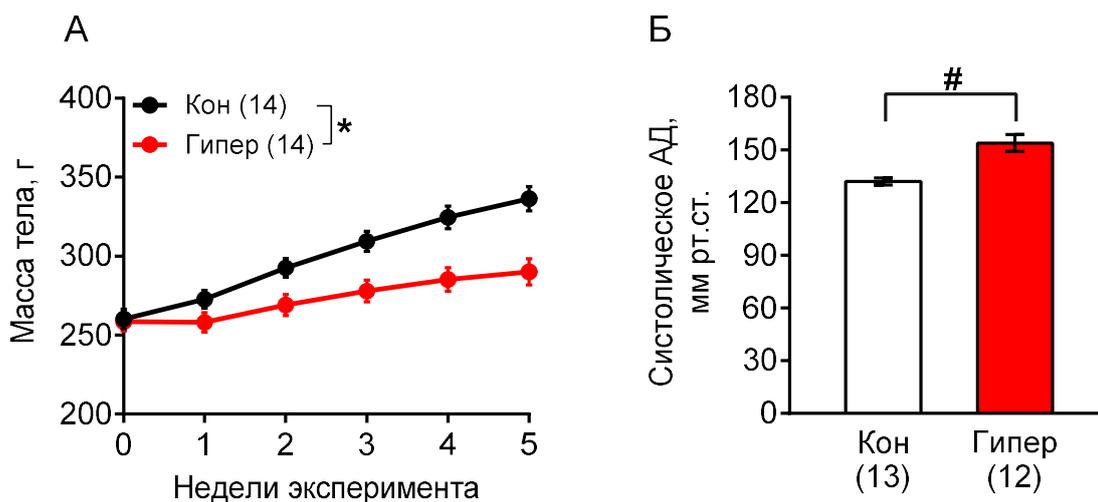


Рис.9. Показатели, характеризующие экспериментальную модель гипертиреоза у крыс: А - динамика массы тела; Б - систолическое артериальное давление. Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * - $p<0.05$ (двухфакторный дисперсионный анализ); # - $p<0.05$ (непарный критерий Стьюдента). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

Для оценки локального синтеза и рецепции тиреоидных гормонов при изменении тиреоидного статуса определяли содержание мРНК D2 и рецепторов TR α в артериях икроножной мышцы. Гипертиреоз вызывал подавление экспрессии D2 (Рис.10А), но не влиял на уровень экспрессии ядерных рецепторов (Рис.10Б,В). Соотношение рецепторов TR α 1/TR α 2 в артериях крыс также не отличалось (1.19 ± 0.19 и 1.07 ± 0.19 в группах контроль и гипертиреоз, соответственно, $p>0.05$, непарный критерий Стьюдента).

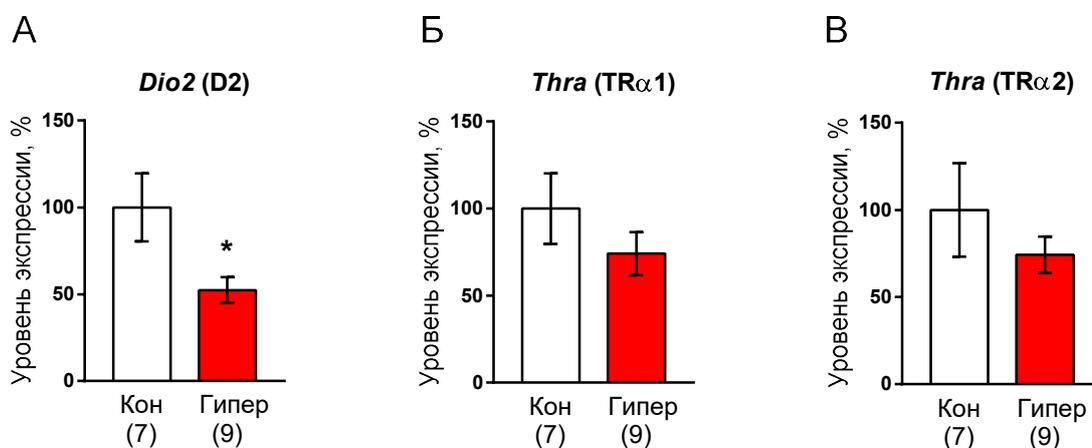


Рис.10. Относительное содержание мРНК генов дейодиназы 2 типа и ядерных рецепторов тиреоидных гормонов в артериях икроножной мышцы крыс с экспериментальным

гипертиреозом. Над диаграммами приведены названия генов и кодируемых ими белков. Данные нормированы на геометрическое среднее экспрессии *Actb* и *Gapdh*. Средний уровень экспрессии гена в группе контрольных крыс принят за 100%. Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * - $p<0.05$ по сравнению с контрольной группой (непарный критерий Стьюдента). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

Кроме того, мы оценивали содержание белка D2 в артериях крыс. Гипертиреоз не влиял на уровень белка D2 в артериях икроножной мышцы (Рис.11).

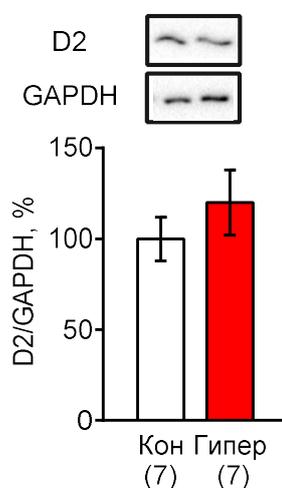


Рис.11. Относительное содержание белка дейодиназы 2 типа в артериях икроножной мышцы крыс с экспериментальным гипертиреозом. Данные нормированы на содержание GAPDH в том же образце. Среднее значение в группе контрольных крыс принято за 100%. Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. # - $p<0.05$ по сравнению с контрольной группой (непарный критерий Стьюдента). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что T_3 является одним из важных факторов регуляции экспрессии D2 на транскрипционном уровне в резистивных артериях скелетных мышц крысы. Избыток T_3 в крови приводит к снижению содержания мРНК, но не влияет на уровень белка D2.

3.1.3 Влияние хронической неонатальной десимпатизации на экспрессию дейодиназы 2 типа в артериях икроножной мышцы и тонкого кишечника

Для исследования роли симпатических влияний в регуляции экспрессии D2 в резистивных артериях крыс использовали модель хронической неонатальной десимпатизации (подкожное введение гуанетидина со второго дня жизни). Эффективность данного воздействия контролировали визуально по отсутствию сплетения адренергических нервных волокон в стенке артерий икроножной мышцы и брыжейки (Рис.12).

У крыс с хронической неонатальной десимпатизацией наблюдалось замедление прироста массы тела (Рис.13). Уровень общего T₃ в сыворотке крови был несколько снижен, однако обе формы T₄ и свободный T₃ не отличались от значений в контрольной группе (табл.6), поэтому можно заключить, что хроническая неонатальная десимпатизация не приводила к выраженному изменению тиреоидного статуса животных.

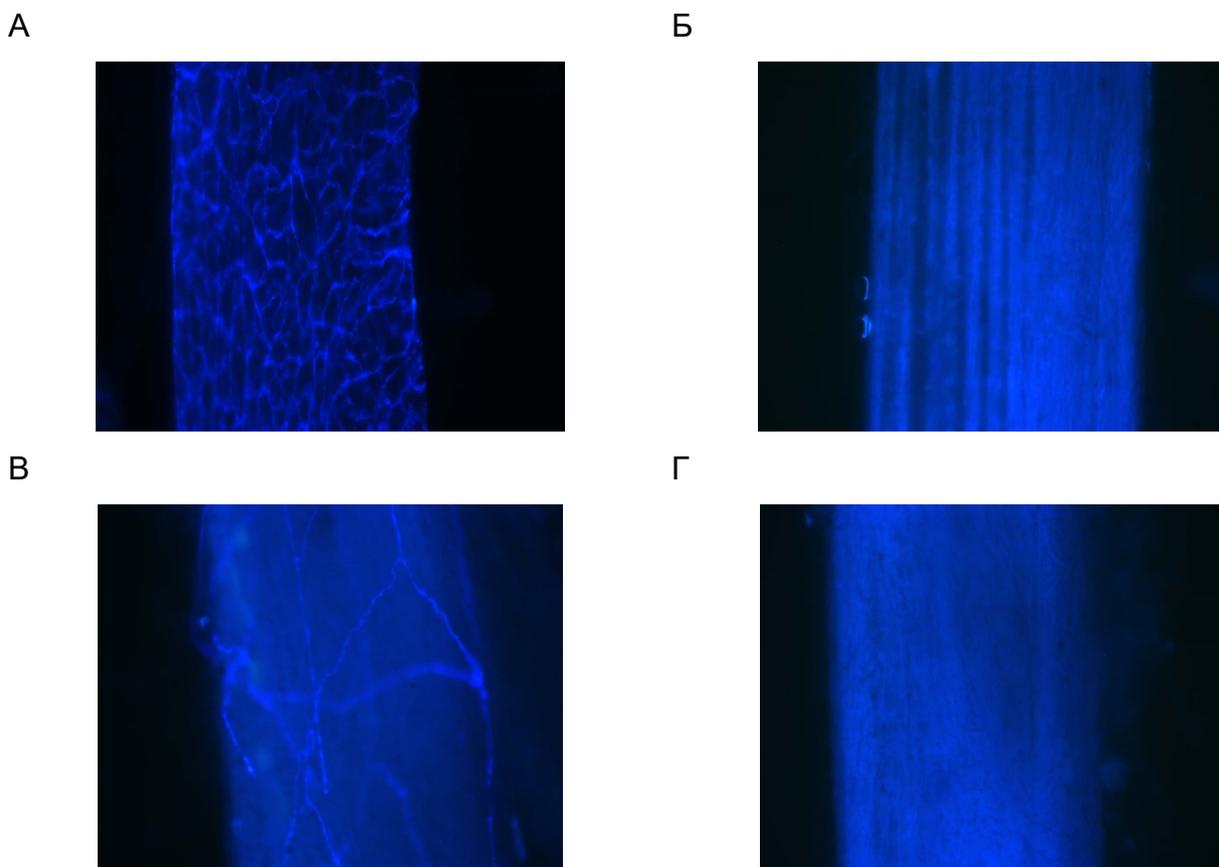


Рис.12. Хроническая неонатальная десимпатизация предотвращает формирование сплетения адренергических волокон в стенке артерий тонкого кишечника (А, Б) и икроножной мышцы (В, Г) взрослых крыс. Визуализация сплетения адренергических волокон проведена при помощи глиоксиловой кислоты. А, В – артерии контрольных крыс, Б, Г – артерии десимпатизированных крыс. Увеличение 20.

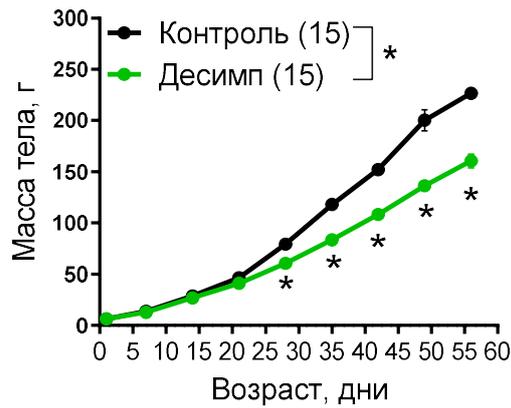


Рис.13. Динамика массы тела крыс с хронической неонатальной десимпатизацией и контрольных животных. Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * - $p < 0.05$ по сравнению с контролем соответствующего возраста (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Сидака). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

Хроническая неонатальная десимпатизация привела к снижению мРНК D2 в артериях икроножной мышцы, но не тонкого кишечника (Рис.14А), при этом экспрессия ядерных рецепторов тиреоидных гормонов $TR\alpha$ осталась неизменной (Рис.14Б,В). Десимпатизация также не повлияла на соотношение изоформ рецепторов $TR\alpha1/ TR\alpha2$.

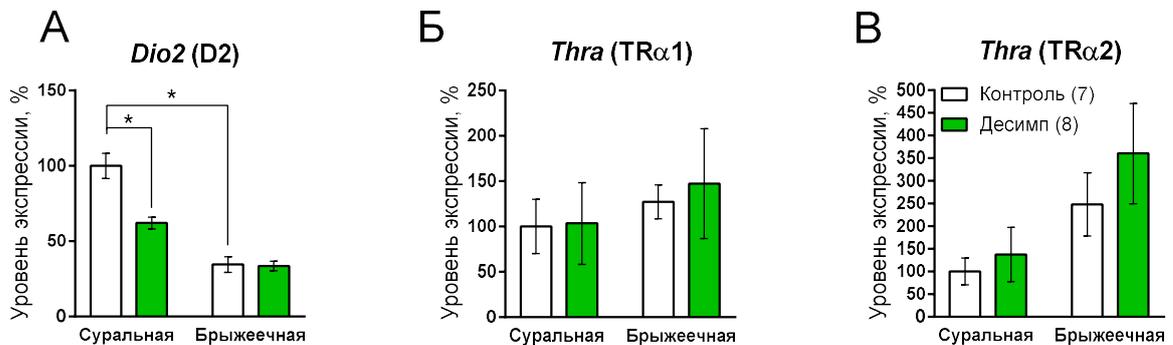


Рис.14. Относительное содержание мРНК дейодиназы 2 типа и ядерных рецепторов тиреоидных гормонов в артериях икроножной мышцы и тонкого кишечника контрольных крыс и крыс с хронической неонатальной десимпатизацией. Над диаграммами приведены названия генов и кодируемых ими белков. Данные нормированы на уровень экспрессии *Rn18s*, среднее значение в группе контрольных крыс принято за 100%. Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * - $p < 0.05$ по сравнению с суральной артерией контрольных крыс (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Сидака). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

Чтобы проверить, сопровождается ли снижение мРНК уменьшением содержания белка D2 в артериях икроножной мышцы, проводили эксперименты с использованием метода Вестерн блот. На Рис.15 видно, что десимпатизация не оказала статистически значимого влияния на уровень белка D2 в артериях икроножной мышцы. Тем не менее, у десимпатизированных животных была обнаружена тенденция к его снижению ($p=0.127$).

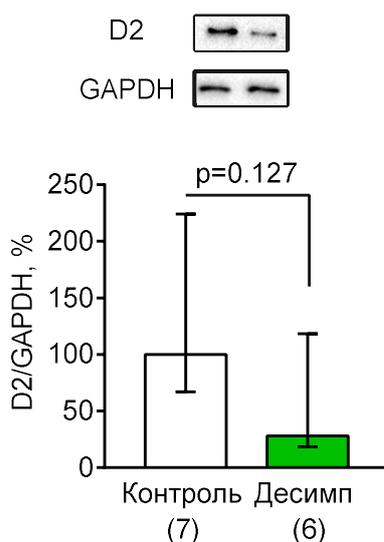


Рис.15. Относительное содержание белка дейодиназы 2 типа в артериях икроножной мышцы крыс с хронической неонатальной десимпатизацией. Данные нормированы на содержание GAPDH в том же образце. Среднее значение в группе контрольных крыс принято за 100%. Данные представлены в виде медиана±интерквартильный размах. $p=0.127$ (критерий Манна-Уитни). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

Можно заключить, что симпатические влияния могут оказывать влияние на экспрессию D2 в резистивных артериях, по крайней мере, на транскрипционном уровне. При этом хроническая десимпатизация приводит к снижению содержания мРНК D2 в артериях скелетных мышц, но не оказывает влияния на артерии брыжейки, хотя у контрольных крыс плотность симпатической иннервации в артериях брыжейки намного выше. Возможно, в артериях брыжейки влияние десимпатизации не проявляется, так как для этой артерии характерен очень низкий уровень экспрессии D2.

3.1.4 Влияние хронического подавления синтеза NO на экспрессию дейодиназы 2 типа в артериях икроножной мышцы и тонкого кишечника

Для выявления роли оксида азота в регуляции экспрессии D2 использовали модель хронического подавления синтеза NO при помощи добавления крысам ингибитора NO-синтазы L-NAME в питьевую воду (500 мг/л, 65 мг/кг/сут) в течение 11 дней. Верификацию модели осуществляли путем измерения концентрации метаболитов оксида азота в крови. Потребление L-NAME приводило к значимому снижению содержания нитритов и нитратов в сыворотке крови животных (Рис.16А), что подтверждает эффективность использованной экспериментальной модели.

Потребление L-NAME не оказывало влияния на прирост массы тела крыс (Рис.16Б), а также на содержание тиреоидных гормонов в их крови (табл.6). Подавление синтеза оксида азота вызывало стойкое увеличение систолического артериального давления (Рис.16В).

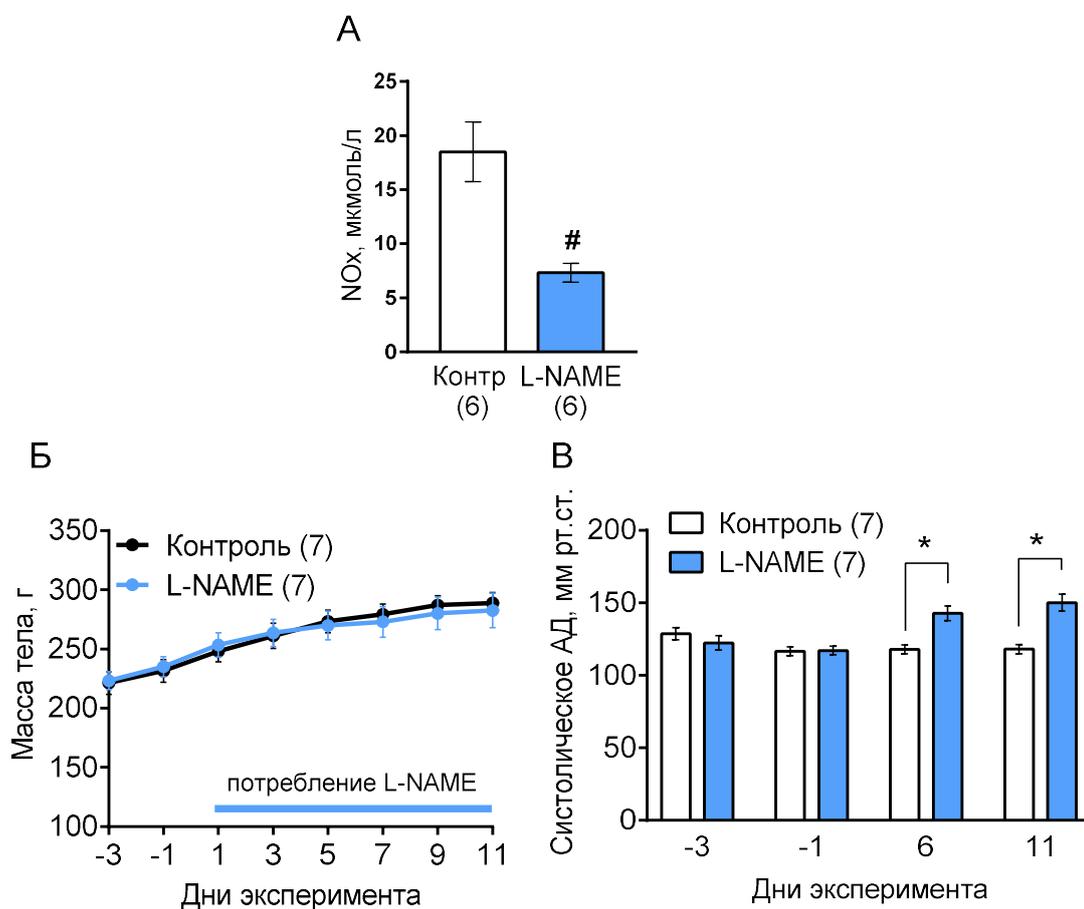


Рис. 16. Показатели, характеризующие экспериментальную модель хронического подавления синтеза NO: А - содержание метаболитов NO в сыворотке крови крыс; Б - динамика массы тела; В - динамика систолического артериального давления. Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. # - $p < 0.05$ (непарный критерий Стьюдента); * - $p < 0.05$

по сравнению с соответствующей контрольной группой (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Сидака). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

Подавление синтеза оксида азота не влияло на уровень мРНК D2 и ядерных рецепторов тиреоидных гормонов TR α ни в артериях икроножной мышцы, ни в артериях тонкого кишечника (Рис.17). В соответствии с этим, соотношение изоформ TR α 1/TR α 2 также не отличалось. Уровень белка D2 в суральной артерии десимпатизированных крыс не был изменен по сравнению с контролем (Рис.18). Полученные результаты позволяют заключить, что оксид азота не участвует в регуляции экспрессии D2 в артериях икроножной мышцы и тонкого кишечника крыс.

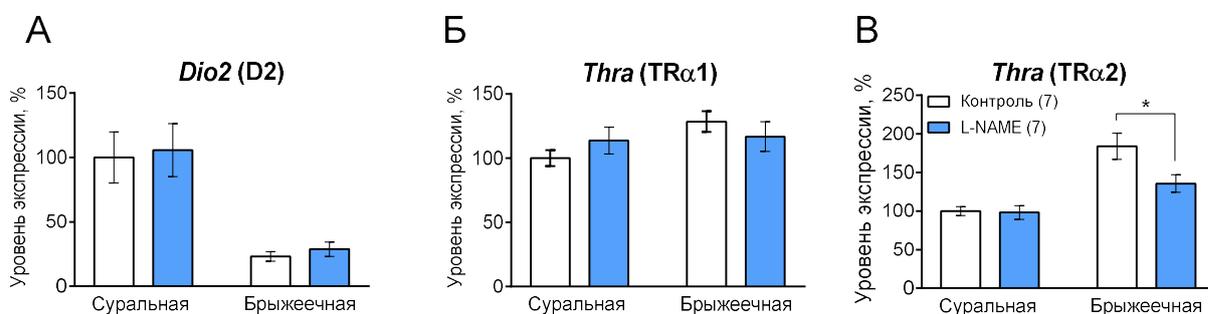


Рис 17. Относительное содержание мРНК дейодиназы 2 типа и ядерных рецепторов тиреоидных гормонов в артериях икроножной мышцы и тонкого кишечника контрольных крыс и крыс с хроническим подавлением синтеза NO. Над диаграммами приведены названия генов и кодируемых ими белков. Данные нормированы на уровень экспрессии *Rplp0*, среднее значение в группе контрольных крыс принято за 100%. Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

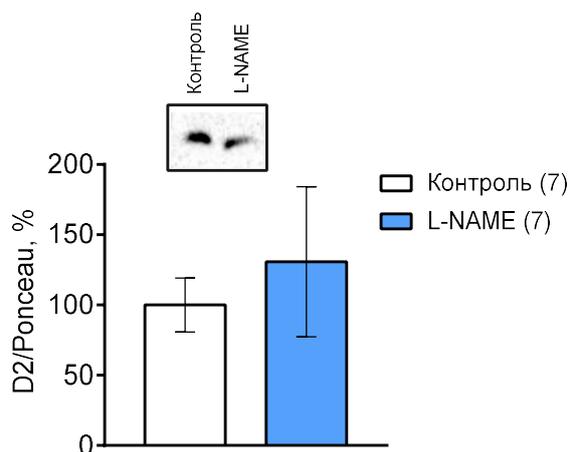


Рис.18. Относительное содержание белка дейодиназы 2 типа в артерии икроножной мышцы в модели хронического подавления синтеза NO. Репрезентативные части мембран представлены в верхней части графика. Данные нормированы на общее содержание белка (окраска Ponceau) на дорожке с соответствующим образцом, среднее значение в группе контрольных крыс для каждого типа артерий принято за 100%. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

3.2 Результаты исследования функциональной роли дейодиназы 2 типа в артериях икроножной мышцы с использованием методики культивирования

Для исследования функциональной роли дейодиназы 2 типа в артериях икроножной мышцы была использована методика культивирования сегментов сосудов (organ culture) с последующей регистрацией вазомоторных реакций в изометрическом режиме (система wire myograph). Роль дейодиназы 2 типа в регуляции тонуса артерий и экспрессии генов анализировали путем сопоставления соответствующих показателей для артерий, культивированных в отсутствие и в присутствии ингибитора 5'-дейодирования иопаноевой кислоты.

Так как культивирование сосудов может сопровождаться значительными изменениями экспрессии широкого спектра генов (Bergdahl et al., 2005; Cao et al., 2006; Manoury et al., 2009; Zheng et al., 2013), было необходимо определить срок культивирования, в течение которого не происходит значительных изменений уровня экспрессии D2. Кроме того, при культивировании может происходить сдвиг фенотипа гладкомышечных клеток артерий в сторону пролиферативного, что будет негативно влиять на способность артерий к развитию сокращения (Sprinkle 1987; Morita et al., 2010) и осложнять анализ результатов. Поэтому предварительно была проведена отдельная экспериментальная серия с целью подбора оптимальных условий культивирования.

3.2.1 Динамика изменений экспрессии дейодиназы 2 типа и TR α при культивировании артерий

Культивирование артерий икроножной мышцы в течение 8, 24 и 48 часов не приводило к значимому падению в них содержания мРНК D2 (Рис.19). Тем не менее, была обнаружена тенденция к снижению содержания мРНК D2 при культивировании на протяжении 48 часов по сравнению с 8 часами ($p=0.09$). Поскольку это была подготовительная серия экспериментов, объем выборки был невелик. Возможно, при увеличении числа животных в группах это различие достигло бы статистической значимости.

На всех исследованных сроках культивирование приводило к снижению уровня мРНК функциональных ядерных рецепторов тиреоидных гормонов TR α 1 (Рис.20А), но не влияло на экспрессию TR α 2 (Рис.20Б). Тем не менее, соотношение TR α 1/TR α 2 не изменялось ни на одном из сроков культивирования (Инт – 0.99 ± 0.15 ; 8ч – 0.77 ± 0.33 ; 24ч – 0.86 ± 0.1 ; 48ч – 0.48 ± 0.1 , $p>0.05$, однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Даннета).

Полученные результаты позволяют предположить, что культивирование длительностью до 24 ч не приводит к значительным изменениям экспрессии D2 и чувствительности артерий к тиреоидным гормонам. Следовательно, при таком непродолжительном культивировании ингибирование D2 может быть использовано для анализа ее функциональной роли в артериях.

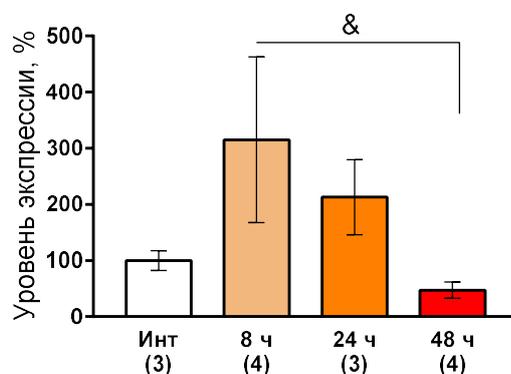


Рис.19. Относительное содержание мРНК дейодиназы 2 типа (ген *Dio2*, белок D2) в артериях икроножной мышцы крысы, культивированных в течение 8 ч, 24 ч и 48 ч. Инт (интактные) – артерии, не подвергавшиеся культивированию. Данные нормированы на уровень экспрессии *Actb*. Средний уровень экспрессии генов в интактной группе принят за 100%. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. & - $p=0.09$ (однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Даннета). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

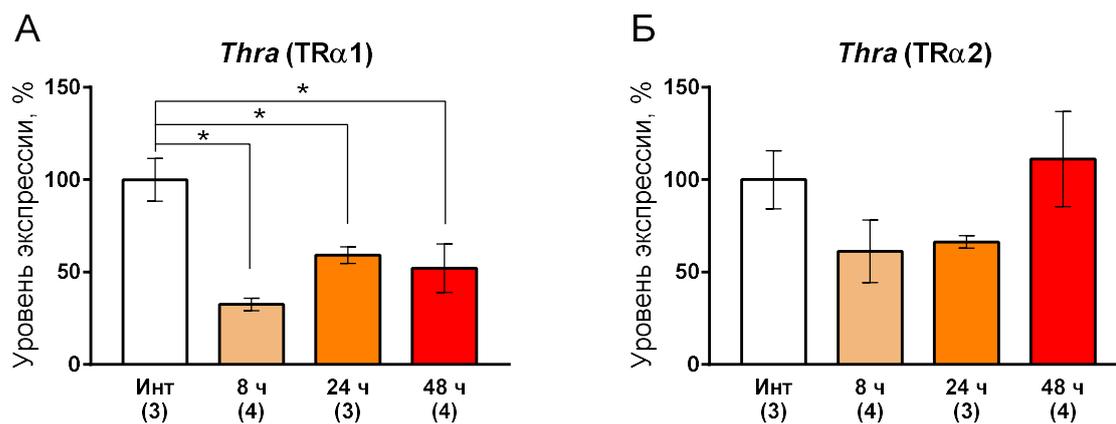


Рис.20. Относительное содержание мРНК ядерных рецепторов тиреоидных гормонов в артериях икроножной мышцы крысы, культивированных в течение 8 ч, 24 ч и 48 ч. Инт (интактные) – артерии, не подвергавшиеся культивированию. Над диаграммами приведены названия генов и кодируемых ими белков. Данные нормированы на уровень экспрессии *Actb*. Средний уровень экспрессии генов в интактной группе принят за 100%. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0.05$ по сравнению с интактными артериями (однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Даннета). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

3.2.2 Влияние культивирования в течение 12 ч на реакции сокращения и расслабления артерий

На основании полученных данных об динамике экспрессии D2 длительность культивирования была выбрана равной 12 ч. Такой срок был удобен для проведения экспериментов: культивирование проходило в течение ночи, а на следующее утро начинали функциональные исследования. Чтобы оценить влияние культивирования на функциональные характеристики артерий, проводили сравнение реакций сокращения и расслабления свежеизолированных (интактных) и культивированных в течение 12 ч препаратов.

Культивирование не оказывало влияния на способность артерий к развитию сократительных ответов на метоксамин (Рис.21А). Однако при выражении силы в процентах от максимума реакции культивированных сегментов были сниженными (Рис.21Б). Нужно отметить, что ослабление сократительных ответов наблюдалось только в центральной области использованного диапазона концентрациях метоксамина – 1 мкМ и 3 мкМ (Рис.21Б). Соответственно, EC_{50} (концентрация метоксамина, вызывающая полумаксимальный ответ) для культивированных сосудов была выше, чем для интактных (табл. 7), то есть в результате культивирования происходило небольшое снижение чувствительности артерий к метоксамину.

Важно отметить, что при этом не наблюдалось уменьшения максимальной силы сокращения артерий. Внутренний диаметр артерий также оставался неизменным (табл.7).

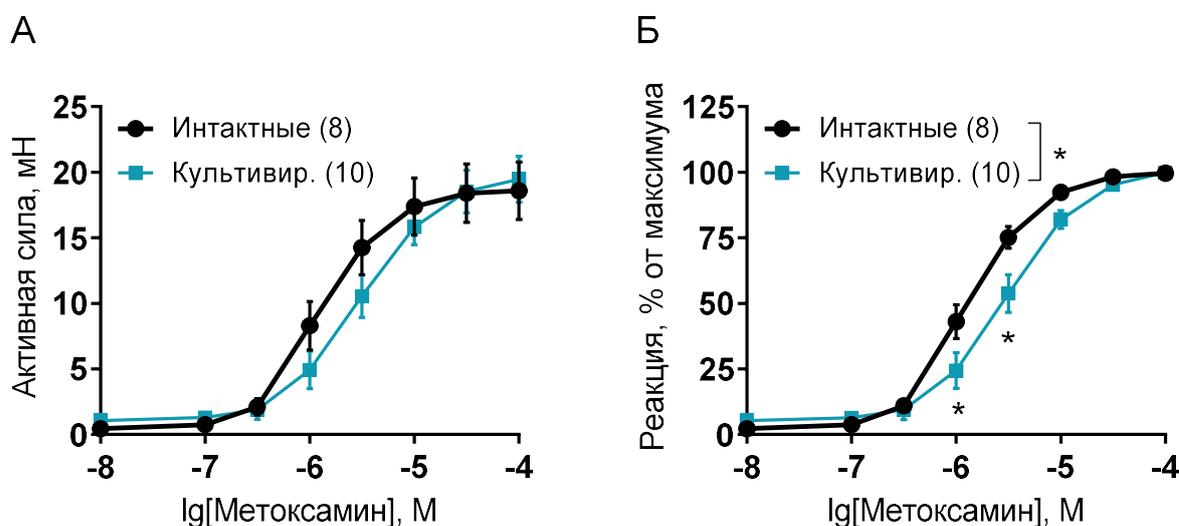


Рис.21. Влияние культивирования в течение 12 часов на сократительные ответы артерий икроножной мышцы крыс на метоксамин. Интактные – артерии, не подвергавшиеся культивированию. А. Сократительные ответы, выраженные в абсолютном значении силы сокращения. Б. Сократительные ответы, выраженные в процентах от максимального сокращения в ответ на метоксамин. Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * - $p<0.05$ по сравнению с интактными артериями (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Сидака). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

Таблица 7. Значения внутреннего диаметра (d_{100}), максимальной силы сокращения и EC_{50} для интактных (некультивированных) и культивированных в течение 12 ч артерий икроножной мышцы.

Показатели	Интактные (n=8)	Культивированные (n=10)
d_{100} , мкм	330.3±16.8	331.7±14.3
Максимум, мН	17.7±2.2	19.5±1.8
EC_{50} , мкМ	1.47±0.27	3.39±0.64*

Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * - $p<0.05$ по сравнению с интактными артериями (непарный критерий Стьюдента).

Культивирование не влияло на эндотелий-зависимую реакцию расслабления артерии в ответ на ацетилхолин (Рис.22), то есть функциональная активность эндотелия при данной постановке эксперимента сохранялась.

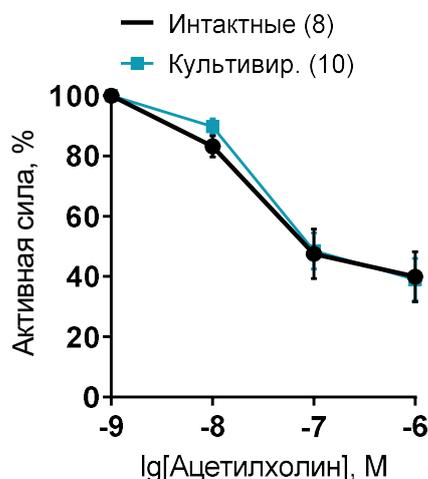


Рис 22. Реакции эндотелий-зависимого расслабления на ацетилхолин интактных (не подвергавшихся культивированию) и культивированных в течение 12 часов артерий икроножной мышцы крысы. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

Таким образом, культивирование в течение 12 часов оказывало лишь умеренное влияние на вазомоторные реакции артерий, что позволило использовать данный срок культивирования в экспериментах по анализу функциональной роли D2 в артериях.

3.2.3 Влияние ингибитора 5'-дейодирования на сократительные ответы и тоническую продукцию оксида азота в артериях

Чтобы оценить функциональную роль D2 в сокращении артерий, проводили 12-часовое культивирование в присутствии или в отсутствие ингибитора 5'-дейодирования иопаноевой кислоты (100 мкМ), или субстрата D2 T₄. Следует отметить, что концентрация T₄ составляла 50 пМ, что примерно соответствует концентрации свободного T₄ в крови крыс с эутиреоидным статусом (табл.6, группы «Контроль»). Мы предполагали, что сократительные ответы артерий, культивированных в присутствии только иопаноевой кислоты, позволят оценить функциональную роль D2 в сосудах, связанную с превращением остаточного тканевого T₄ в T₃, а артерий, культивированных в присутствии T₄ или T₄ в комбинации с иопаноевой кислотой - функциональную роль D2 в сосудах в условиях физиологической концентрации ее субстрата (T₄).

Культивирование в присутствии иопаноевой кислоты, T_4 или их комбинации не повлияло на исходные сократительные ответы артерий на метоксамин (Рис.23). Однако это не исключает возможных изменений в регуляции сокращения гладкой мышцы со стороны эндотелия. Известно, что тонически продуцируемый эндотелием сосудов NO может ослаблять сократительные ответы артерий на метоксамин (Gaynullina et al., 2017; Sofronova et al., 2016). Тиреоидные гормоны способны влиять на экспрессию и активность eNOS и тем самым усиливать продукцию оксида азота (Castro de et al., 2015; Toral et al., 2018). Мы оценивали влияние тонической продукции NO на сокращение артерий по изменению сократительных ответов после ингибирования синтеза NO: культивированные в различных условиях артерии инкубировали с L-NNA (100 мкМ) или эквивалентным объемом растворителя (H_2O , 50 мкл), после чего повторяли зависимость «концентрация-эффект» на метоксамин (Рис.24).

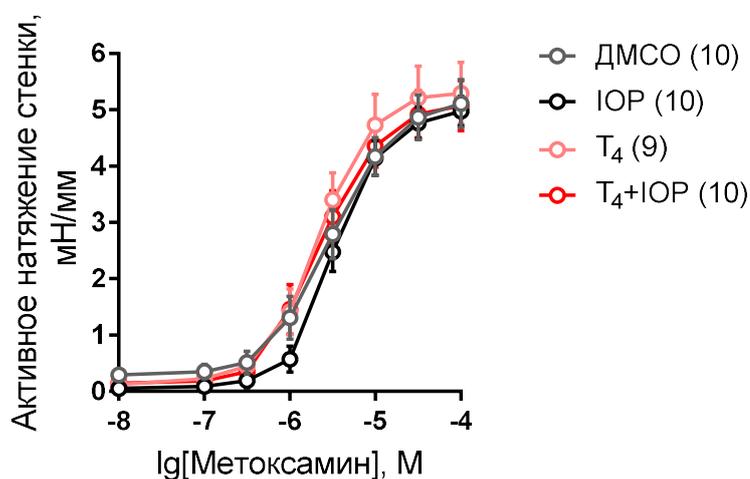


Рис.23. Сократительные ответы на метоксамин артерий икроножной мышцы, культивированных 12 часов в присутствии растворителя (ДМСО), ингибитора дейодиназы 2 типа иопаноевой кислоты (IOP, 100 мкМ), T_4 (50 пМ) или комбинации иопаноевой кислоты и T_4 (T_4 +IOP). Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

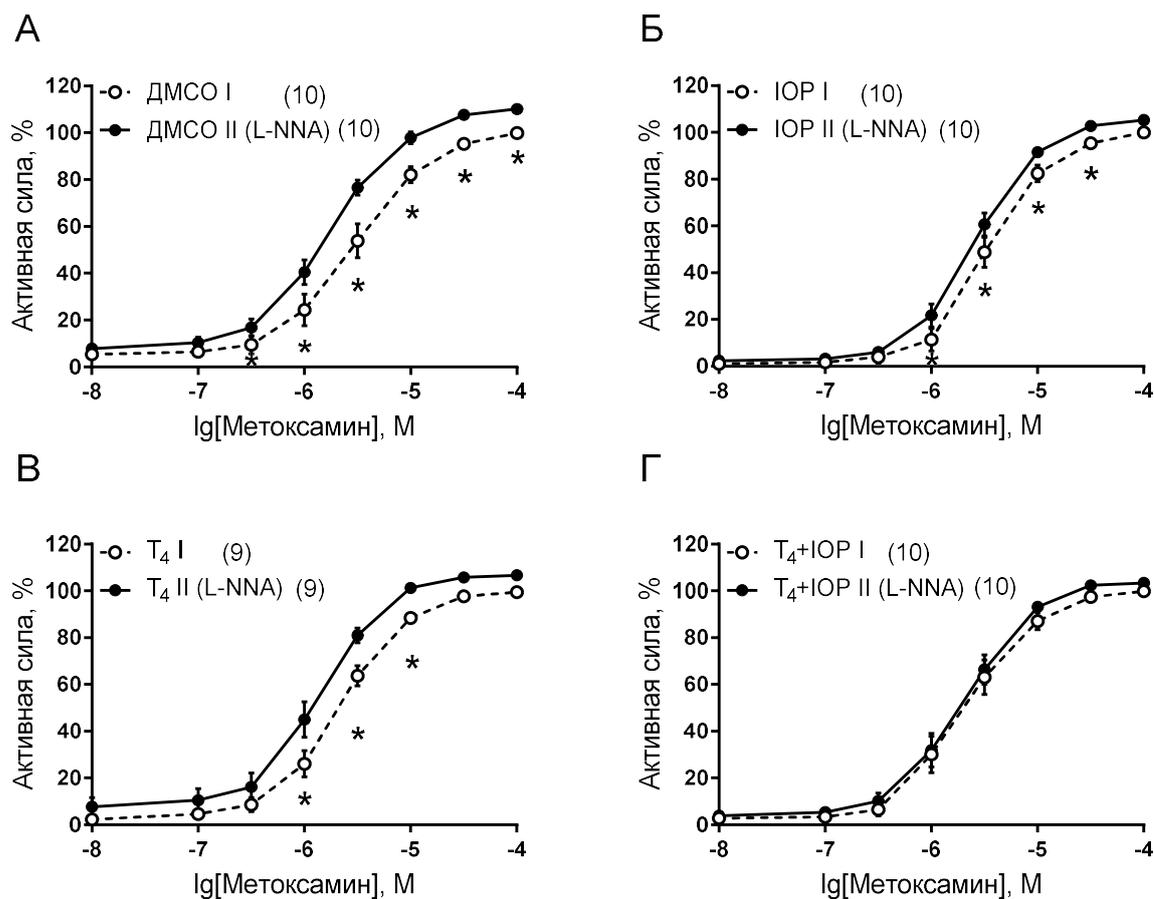


Рис.24. Влияние блокады продукции оксида азота при помощи L-NNA (100 мкМ) на сократительные ответы на метоксамин артерий икроножной мышцы, культивированных 12 часов в присутствии: А – растворителя (ДМСО), Б – ингибитора 5'-дейодирования иопаноевой кислоты (IOP, 100 мкМ), В – T₄ (50 пМ), Г – комбинации иопаноевой кислоты и T₄ (T₄+IOP). I – зависимость «концентрация-эффект» на метоксамин до инкубации с L-NNA, II – зависимость «концентрация-эффект» на метоксамин после инкубации с L-NNA. Данные выражены в процентах от максимума соответствующей зависимости I и представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * - p<0.05 (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Сидака). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

Инкубация с L-NNA сопровождалась значительным увеличением сократительных ответов артерий, культивированных в присутствии ДМСО или T₄ (Рис.24А,В). Такой прирост ответов на метоксамин происходил в результате блокады негативного тонического влияния NO на сокращение артерий, то есть после культивирования в присутствии ДМСО или T₄ сохранялся синтез NO в стенке сосудов. Эффект L-NNA на сократительные ответы также можно оценить по увеличению чувствительности артерий к метоксамину: значение EC₅₀ значимо уменьшалось после инкубации с L-NNA у артерий, культивированных в присутствии

ДМСО или T₄ (табл.8). После культивирования в присутствии иопаноевой кислоты влияние L-NNA на сократительные ответы артерий было менее выраженным (Рис.24Б), а в присутствии иопаноевой кислоты в комбинации с T₄ отсутствовало (Рис.24Г). Иопаноевая кислота также предотвращала увеличение чувствительности к метоксамину: параметр EC₅₀ не изменялся после инкубации с L-NNA в группах IOP и T₄ +IOP (табл.8).

На основе полученных данных можно предположить, что активность дейодиназы 2 типа в стенке артерий скелетных мышц необходима для поддержания внутриклеточной концентрации T₃ на уровне, достаточном для обеспечения антиконстрикторного влияния NO.

Таблица 8. Значения EC₅₀ для зависимостей «концентрация-эффект» до и после инкубации L-NNA (100 мкМ) артерий икроножной мышцы, культивированных в течение 12 часов в различных условиях.

Группа	EC ₅₀ , мкМ	
	До инкубации с L-NNA	После инкубации с L-NNA
ДМСО (n=10)	3.47±0.63	1.91±0.21*
IOP (n=10)	3.81±0.73	2.73±0.44
T ₄ (n=9)	2.34±0.34	1.46±0.20*
T ₄ +IOP (n=10)	2.55±0.72	2.32±0.52

IOP – иопаноевая кислота. Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * - p<0.05 по сравнению со значением данной группы до инкубации (парный критерий Стьюдента).

3.2.4 Влияние ингибитора 5'-дейодирования на вклад оксида азота в эндотелий-зависимое расслабление артерий

Для оценки функциональной роли D2 в эндотелий-зависимом расслаблении артерий также проводили 12-часовое культивирование в присутствии или в отсутствие ингибитора 5'-дейодирования иопаноевой кислоты или T₄, затем регистрировали зависимость «концентрация-эффект» на ацетилхолин артерий, предварительно сокращенных метоксамином (10 мкМ).

Культивирование в присутствии иопаноевой кислоты, T₄ или их комбинации не повлияло на расслабление артерий в ответ на ацетилхолин, хотя в группах, культивированных в присутствии иопаноевой кислоты, наблюдалась тенденция к уменьшению реакций расслабления (Рис.25А). Эндотелий-независимое расслабление артерий на DEA-NO (донор NO), характеризующее NO-чувствительность гладкой мышцы, не различалось у четырех групп артерий (Рис.25Б). Нужно отметить, что NO является важным посредником эндотелий-

зависимой реакции на ацетилхолин (Гайнуллина и др., 2013), и вклад NO в эндотелий-зависимое расслабление мог измениться под действием иопаноевой кислоты. В связи с этим мы повторяли зависимость «концентрация-эффект» на ацетилхолин после инкубации артерий с L-NNA (100 мкМ) или эквивалентным объемом растворителя (H₂O).

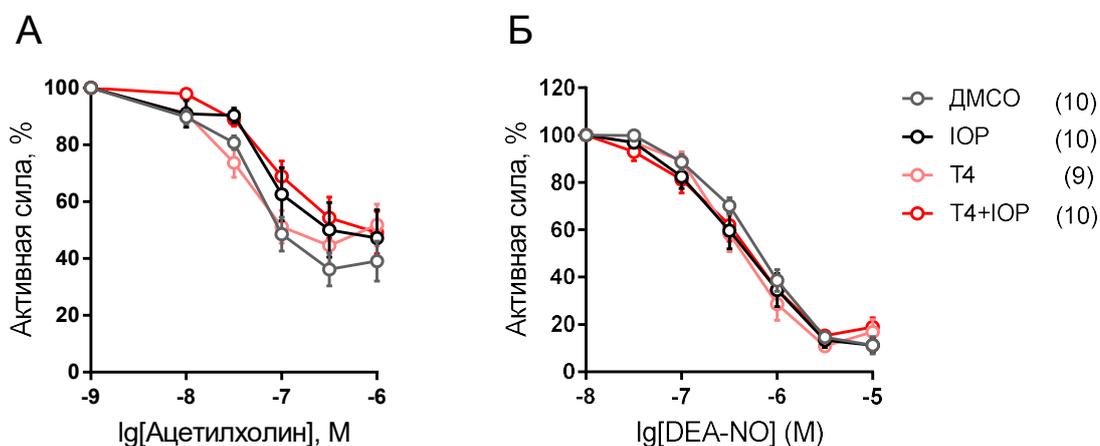


Рис.25. Реакции расслабления артерий икроножной мышцы, культивированных 12 часов в присутствии растворителя (ДМСО), ингибитора 5'-дейодирования иопаноевой кислоты (ИОР, 100 мкМ), T₄ (50 пМ) или комбинации иопаноевой кислоты и T₄ (T₄+ИОР). А. Эндотелий-зависимое расслабление в ответ на ацетилхолин. Б. Эндотелий-независимое расслабление в ответ на донор NO DEA-NO. Эксперименты с DEA-NO проводили в присутствии L-NNA (100 мкМ), чтобы исключить влияние синтезируемого эндотелием NO. Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

Инкубация с L-NNA вызывала значительное уменьшение эндотелий-зависимого расслабления артерий, культивированных в присутствии ДМСО или T₄ (Рис.26А,В), и не оказывала влияния на расслабление артерий, культивированных в присутствии иопаноевой кислоты (группы ИОР, T₄+ИОР) (Рис.26Б, Г). По всей видимости, активность дейодиназы 2 типа в стенке артерий икроножной мышцы необходима для увеличения внутриклеточной концентрации T₃ и поддержания вазомоторной роли NO (его вклада в эндотелий-зависимое расслабление артерий).

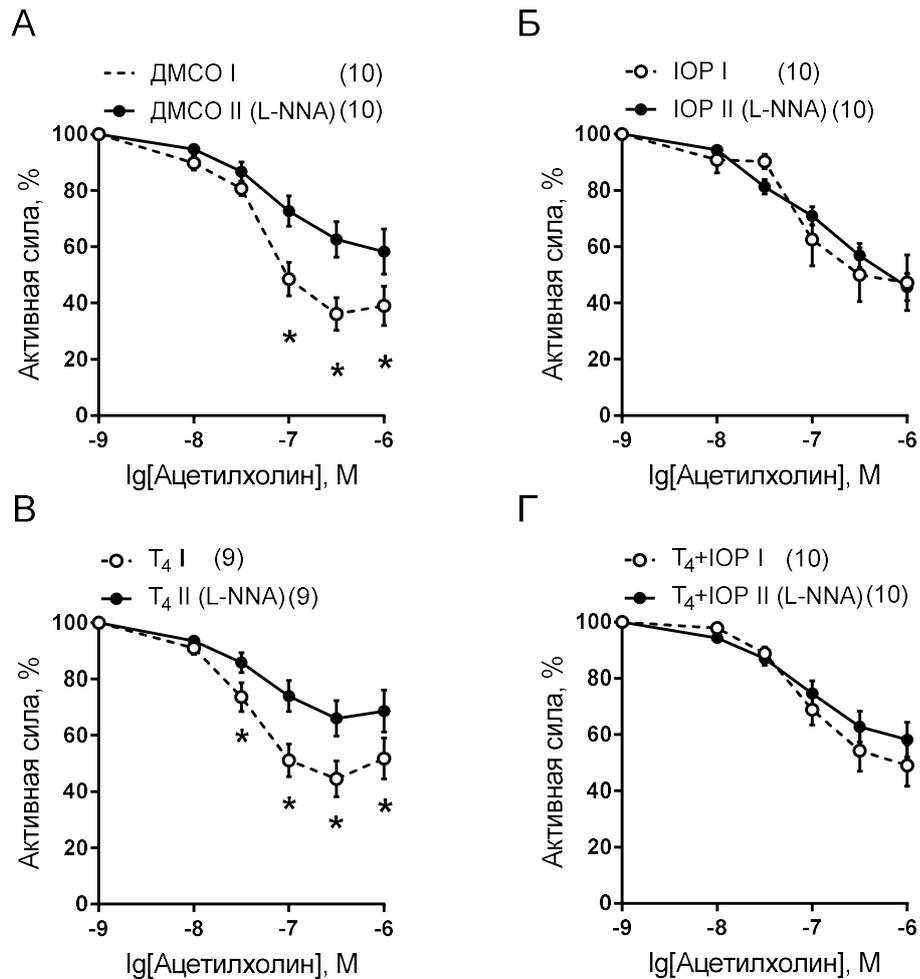


Рис 26. Эффект блокады продукции оксида азота при помощи L-NNA (100 мкМ) на эндотелий-зависимое расслабление в ответ на ацетилхолин артерий икроножной мышцы, культивированных 12 часов в присутствии: А – растворителя (ДМСО), Б – ингибитора 5'-дейодирования иопаноевой кислоты (IOP), В – T₄, Г – комбинации иопаноевой кислоты и T₄ (T₄+IOP). I – зависимость «концентрация-эффект» на метоксамин до инкубации с L-NNA, II – зависимость «концентрация-эффект» на метоксамин после инкубации с L-NNA. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. * - p<0.05 (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Сидака). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

3.2.5 Влияние ингибитора 5'-дейодирования на экспрессию дейодиназы 2 типа и TRα

Для оценки состояния системы тиреоидной регуляции артерий после 12-часового культивирования в присутствии иопаноевой кислоты, T₄, их комбинации или растворителя ДМСО определяли уровень мРНК генов D2 и ядерных рецепторов тиреоидных гормонов.

Культивирование артерий в присутствии иопаноевой кислоты или ее комбинации с T₄ приводило к значимому снижению содержания мРНК D2 (Рис.27А). Культивирование только в присутствии T₄ не влияло на уровень мРНК D2 (Рис.27А). Иопаноевая кислота, T₄ или их комбинация не влияли на экспрессию рецепторов тиреоидных гормонов TRα1 и TRα2 (Рис.27Б,В). Соотношение рецепторов TRα1/TRα2 составило 0.32±0.02, 0.24±0.01*, 0.28±0.01 и 0.25±0.03* в группах ДМСО, IOP, T₄ и T₄+IOP, соответственно (* - p<0.05 по сравнению с группой ДМСО, однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Даннета).

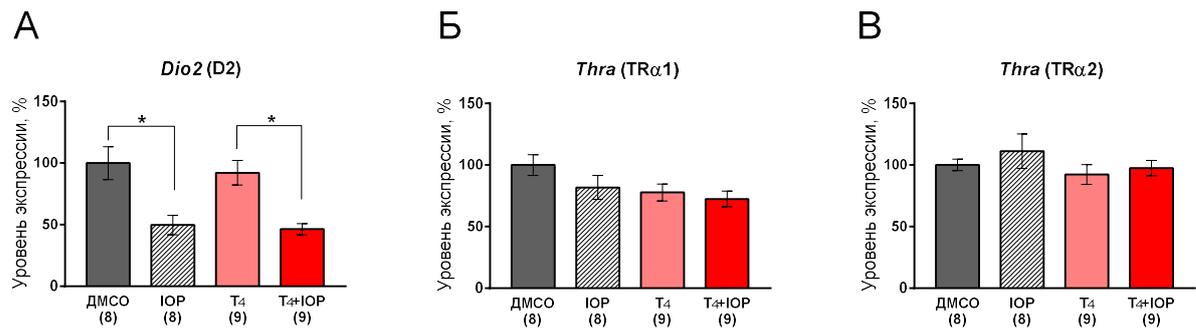


Рис.27. Влияние 12-часового культивирования в присутствии растворителя (ДМСО), ингибитора 5'-дейодирования иопаноевой кислоты (IOP, 100 мкМ), T₄ (50 пМ) или комбинации T₄+IOP на относительное содержание мРНК генов дейодиназы 2 типа и ядерных рецепторов тиреоидных гормонов. Над диаграммами приведены названия генов и кодируемых ими белков. Данные нормированы на уровень экспрессии *Actb*. Средний уровень экспрессии генов в группе ДМСО принят за 100%. Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * - p<0.05 (однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Сидака). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

Таким образом, подавление 5'-дейодирования при помощи иопаноевой кислоты как в присутствии, так и в отсутствие T₄ вызывает нарушение тиреоидной регуляции артерий икроножной мышцы на уровне транскрипции, уменьшая содержание мРНК D2 и, возможно, несколько снижая чувствительность клеток к тиреоидным гормонам (судя по уменьшению отношения мРНК TRα1/TRα2).

3.2.6 Влияние ингибитора 5'-дейодирования на экспрессию генов-мишеней геномного действия тиреоидных гормонов

Иопаноевая кислота ингибирует 5'-дейодирование, подавляя внутриклеточную продукцию T₃, что приводит к уменьшению концентрации T₃ внутри ядра (Tusa et al., 1994). При более низком содержании T₃ в ядре должно наблюдаться ослабление геномных эффектов

тиреоидных гормонов, так как T_3 обладает большей аффинностью к ядерным рецепторам, чем T_4 (Schroeder et al., 2014). В частности, должно происходить уменьшение экспрессии T_3 -чувствительных генов. Помимо дейодиназы 2 типа (Mizuma et al., 2001), к числу таких генов, экспрессируемых в стенке артерий, относятся α -актин (актин гладких мышц, ответственный за сокращение) (Wang, Sun, 2010), *Atp2a2* (белок *Serca2*) (Hartong et al., 1994), *Ryr2* (Hudecova et al., 2004) и *NOX1* (Wang, Sun, 2010).

Культивирование артерий в присутствии иопаноевой кислоты или ее комбинации с T_4 приводило к значимому снижению содержания мРНК α -актина и *Serca2*, но не влияло на содержание мРНК *RyR2* и *NOX1* (Рис.28). Можно заключить, что ингибитор 5'-дейодирования вызывает уменьшение экспрессии части исследованных T_3 -чувствительных генов, таких как α -актин и *Serca2*, тогда как экспрессия генов *RyR2* и *NOX1* сравнительно устойчива к этому воздействию.

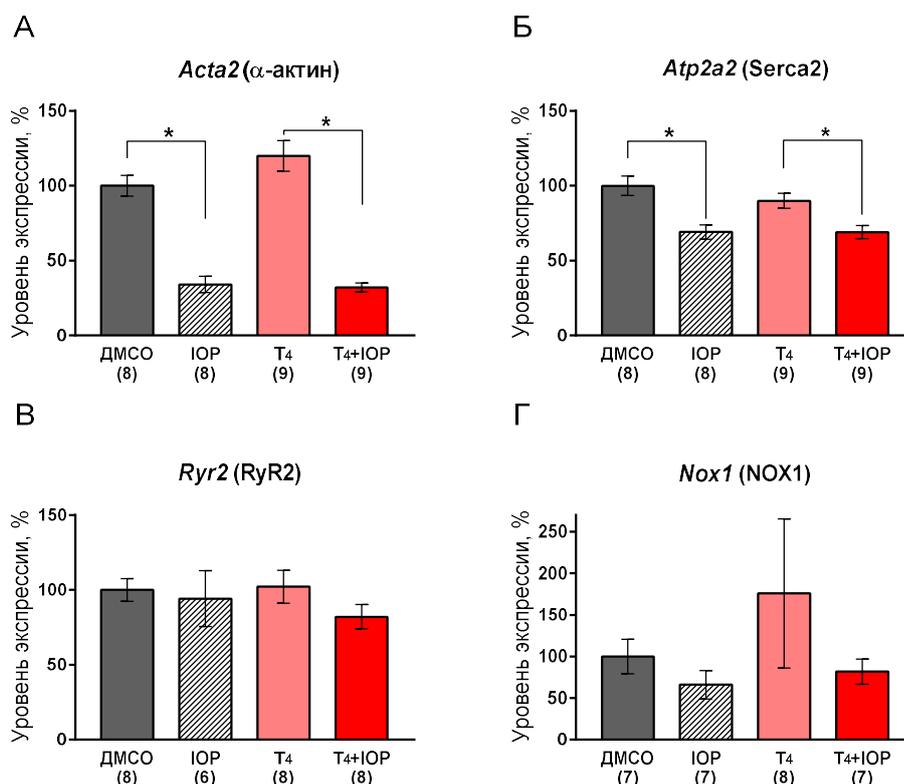


Рис. 28. Влияние 12-часового культивирования в присутствии растворителя (ДМСО), ингибитора 5'-дейодирования иопаноевой кислоты (ИОР, 100 мкМ), T_4 (50 пМ) или комбинации T_4 +ИОР на относительное содержание мРНК генов-мишеней геномного действия тиреоидных гормонов. Над диаграммами приведены названия генов и кодируемых ими белков. Данные нормированы на уровень экспрессии *Actb*. Средний уровень экспрессии генов в группе ДМСО принят за 100%. Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * -

$p < 0.05$ (однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Сидака). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

3.2.7 Влияние ингибитора 5'-дейодирования на экспрессию генов, регулирующих продукцию оксида азота

Полученные нами данные об уменьшении вклада NO в вазомоторные реакции артерий, культивированных в присутствии ингибитора 5'-дейодирования, свидетельствуют об уменьшении биодоступности NO в стенке артерий. Поэтому мы оценивали влияние 12-часового культивирования в присутствии ИОР, T₄, их комбинации или растворителя на экспрессию генов, регулирующих продукцию оксида азота в артериях. Продукция оксида азота в сосудистой стенке может зависеть от активности NO-синтаз, а также аргиназы-2 (Arg2), конкурирующей с NO-синтазами за общий субстрат – L-аргинин (Гайнуллина и др., 2013; Zhang et al., 2004).

Культивирование в присутствии иопановой кислоты или ее комбинации с T₄ не влияло на экспрессию eNOS, nNOS или Arg2 (Рис.29А,Б,Г), но приводило к снижению содержания мРНК индуцибельной NO-синтазы (Рис.29В). Культивирование в присутствии только T₄ не влияло на уровень мРНК всех исследованных генов-регуляторов синтеза NO.

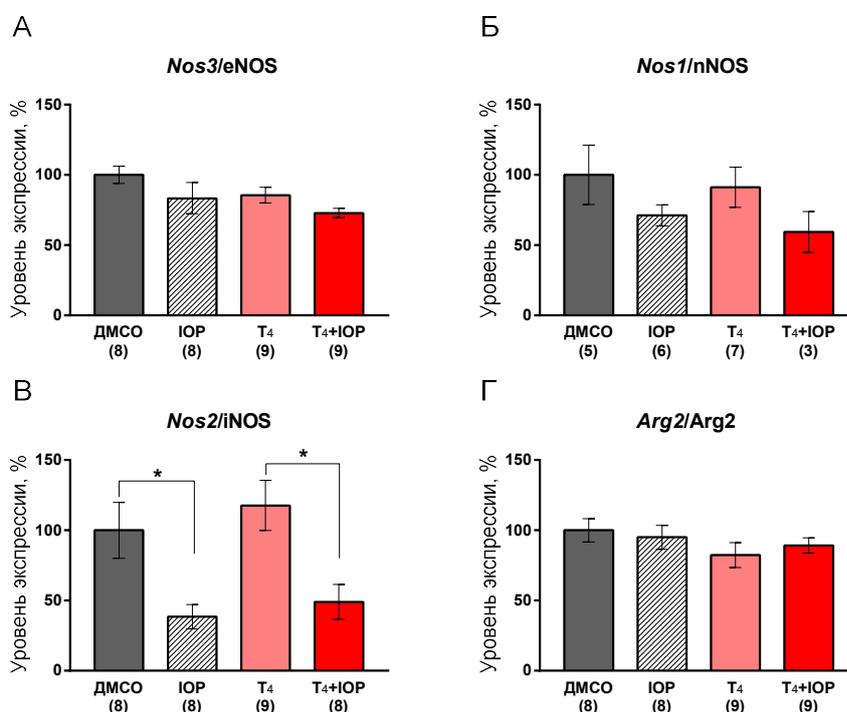


Рис. 29. Влияние 12-часового культивирования в присутствии растворителя (ДМСО), ингибитора 5'-дейодирования иопановой кислоты (ИОР, 100 мкМ), T₄ (50 пМ) или комбинации T₄+ИОР на относительное содержание мРНК генов, регулирующих уровень продукции NO. Над диаграммами приведены названия генов и кодируемых ими белков. Данные нормированы на

уровень экспрессии *Actb*. Средний уровень экспрессии генов в группе ДМСО принят за 100%. Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * - $p<0.05$ (однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Сидака). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

Таким образом, уменьшение вклада NO в вазомоторные реакции артерий под действием ингибитора 5'-дейодирования может быть связано с уменьшением содержания мРНК iNOS, но не связано с изменением уровня мРНК eNOS, nNOS и Arg2.

3.3 Результаты исследования быстрых негеномных эффектов тиреоидных гормонов на артерии икроножной мышцы

Для исследования механизмов быстрого расслабления артерий под действием тиреоидных гормонов был проведен комплекс экспериментов на изолированных сегментах артерий икроножной мышцы. Для идентификации сигнальных каскадов, опосредующих расслабление, в части экспериментов использовали селективные блокаторы и ингибиторы. Важно, что общая длительность действия тиреоидных гормонов в описанных далее экспериментах не превышала 1.5 ч, что позволяет говорить об их негеномном влиянии.

3.3.1 Сравнение реакций расслабления артерии при негеномном влиянии T₃ и T₄

Аппликация T₃ или T₄ в возрастающих концентрациях (0.03-10 мкМ) с 10-минутными интервалами вызывала дозозависимое расслабление предварительно сокращенных метоксамином сегментов артерий икроножной мышцы (Рис.30А,Б). На оригинальной записи видно, что реакция артерий наблюдалась уже через несколько минут после добавления гормона (РРис.30А). При этом эффект T₄ был более выраженным, чем эффект T₃. Значения минимальной эффективной концентрации T₃ и T₄ (концентрации, при которой значение силы в экспериментах с добавлением гормона статистически значимо отличается от соответствующего значения в контрольных экспериментах) составили 10 и 3 мкМ, соответственно (Рис.30Б). В группе ДМСО (растворитель) тонус артерий к концу эксперимента спонтанно снижался до 52.9±4.3% от уровня изначального сокращения. Артерии, которые подвергались действию тиреоидных гормонов, расслаблялись сильнее: до 34.2±5.9% в группе T₃ и до 18.9±3.3% в группе T₄ ($p<0.05$ T₃ vs T₄, однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Сидака). Таким образом, T₄ вызывал более выраженное расслабление артерий икроножной мышцы, чем T₃.

Так как T₄ способен превращаться в T₃ в ходе 5'-дейодирования (Gereben et al., 2008), мы использовали ингибитор 5'-дейодиназы иопаноевую кислоту, чтобы отделить собственные эффекты T₄ от эффектов T₃, образованного из T₄ под действием дейодиназы 2 типа.

Предварительная инкубация сегментов артерий с иопаноевой кислотой не повлияла на быстрое расслабление, вызванное T_4 (Рис.30В). По всей видимости, значимую роль в наблюдаемой быстрой негенеральной вазодилатации играет независимое от дейодирования, то есть собственное, действие T_4 .

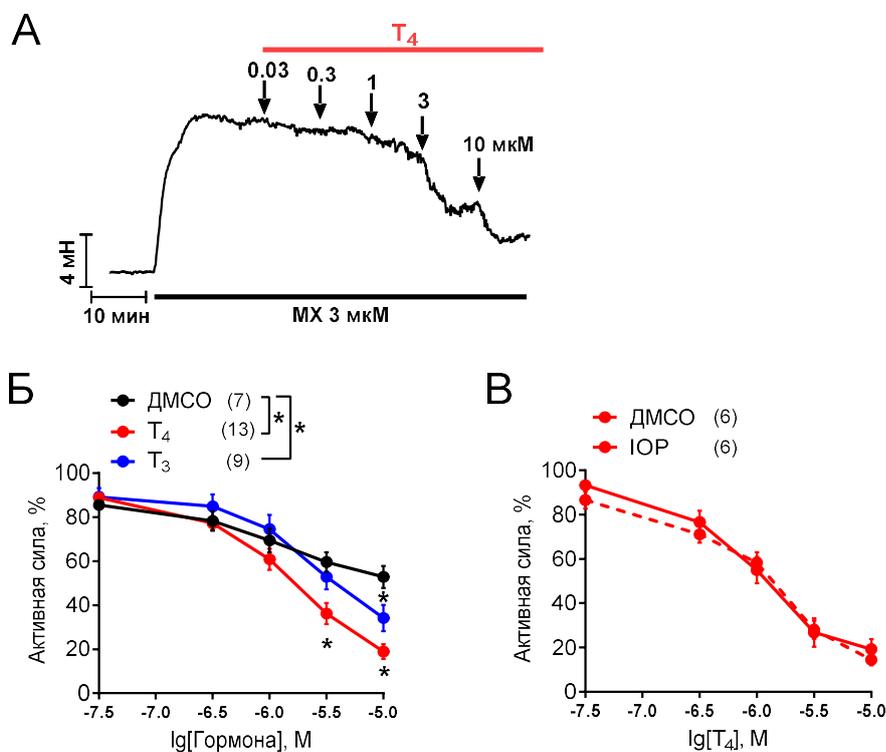


Рис.30. Быстрые эффекты T_3 и T_4 на предсокращенные метоксамином артерии икроножной мышцы. А. Оригинальная запись вызванного T_4 дозозависимого расслабления артерии. Б. Сравнение выраженности эффектов T_3 и T_4 . В. Влияние ингибитора дейодиназы 2 типа (ИОР, 100 мкМ) на вызванную T_4 вазодилатацию. МХ – метоксамин. Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * - $p < 0.05$ по сравнению с группой ДМСО (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

При использовании другого экспериментального протокола короткая 20-минутная инкубация с T_3 или T_4 (10 мкМ) приводила к подавлению сократительных ответов артерий на увеличивающиеся концентрации метоксamina, что проявлялось в виде сдвига зависимости «концентрация-эффект» вправо (Рис.5, 31А,Б). Это согласуется с данными, полученными при добавлении гормонов к предсокращенным артериям (Рис.30Б). Нужно отметить, что использование экспериментального протокола с двумя зависимостями «концентрация-эффект» на метоксамин (как на рис.24) позволяет исключить фактор спонтанного спада тонуса артерий с

течением времени, что упрощает интерпретацию результатов. Кроме того, этот протокол позволяет уменьшить объем растворителя ДМСО, добавляемого в камеру, то есть исследование сократительных ответов артерий происходит в более физиологичных условиях. В связи с этим дальнейшее исследование механизмов вызванного тиреоидными гормонами быстрого расслабления артерий проводили именно по такому протоколу с использованием тиреоидных гормонов в одной и той же концентрации– 10 мкМ.

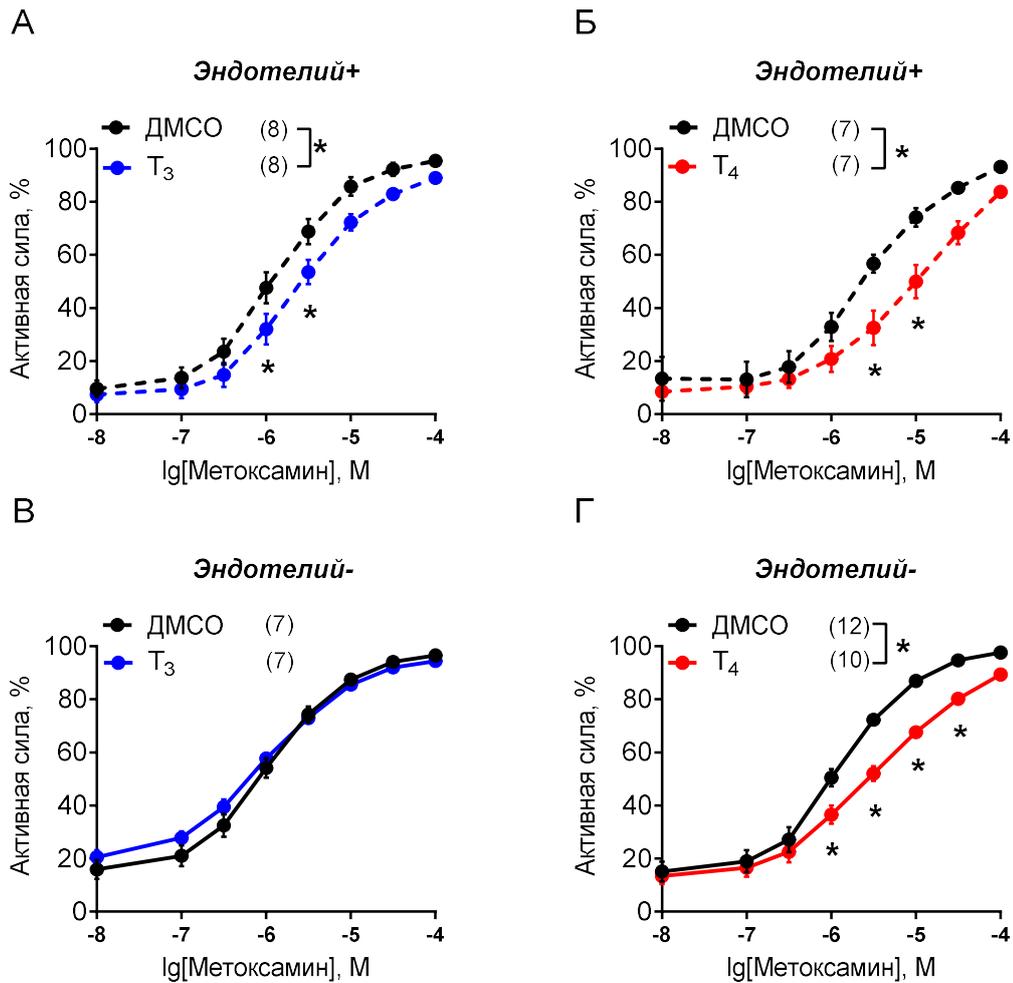


Рис. 31. Зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин артерий с интактным (А, Б) или удаленным (В, Г) эндотелием в присутствии растворителя и Т₃ (А, В) или Т₄ (Б, Г). Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. * - p < 0.05 по сравнению с группой ДМСО (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

3.3.2 Исследование роли эндотелия в расслаблении артерий под действием тиреоидных гормонов

Чтобы определить, участвует ли эндотелий в реализации быстрого расслабления артерий при негеномном действии тиреоидных гормонов, были проведены эксперименты на артериях с интактным и механически удаленным эндотелием (Рис.31).

T₃ подавлял сократительные ответы на метоксамин в артериях с интактным (Рис.31А), но не с удаленным эндотелием (Рис.31В), а T₄ действовал на артерии вне зависимости от наличия эндотелия (Рис.31Б, Г). Интенсивность эффекта T₄, оцененная путем вычисления площади под кривой (в % от соответствующего контроля), не отличалась для сегментов с интактным и удаленным эндотелием: площадь уменьшалась до 72.4±8.2% и 75.0±4.9%, соответственно (p>0.05, непарный критерий Стьюдента). Исходя из полученных результатов, можно заключить, что вызванное T₃ и T₄ быстрое расслабление артерий реализуется по разным механизмам: эндотелий-зависимому в случае T₃, и эндотелий-независимому в случае T₄.

Механизм вызванного T₄ негеномного расслабления артерий, реализующегося на уровне гладкой мышцы, ранее не был исследован, поэтому в дальнейшей части работы мы сосредоточились именно на нем. Все описанные далее функциональные эксперименты были проведены на артериях с удаленным эндотелием.

3.3.3 Влияние блокатора интегрин $\alpha\beta 3$ на расслабление артерий под действием T₄

Одним из рецепторов, который может опосредовать негеномные эффекты T₄, в частности, стимуляцию ангиогенеза, является интегрин $\alpha\beta 3$ (Bergh et al., 2005; Liu et al., 2014). В присутствии блокатора сайта связывания тиреоидных гормонов интегрин $\alpha\beta 3$ тетрака (дезаминированное производное T₄, тетрайдотироуксусная кислота) T₄ не подавлял сократительные ответы артерий с удаленным эндотелием на метоксамин (Рис.32). Таким образом, интегрин $\alpha\beta 3$ опосредует расслабление артерий при негеномном влиянии T₄.

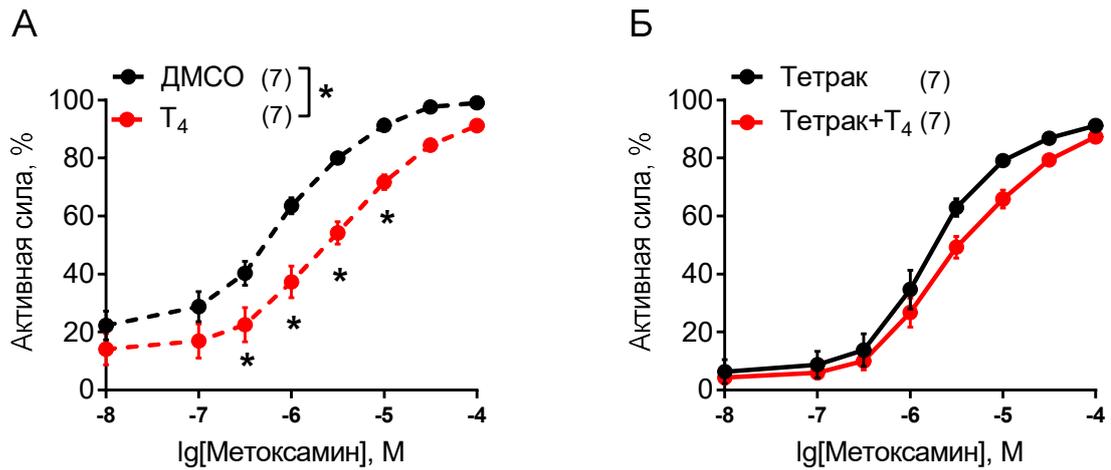


Рис.32. Блокатор интегрин $\alpha\beta_3$ тетрак устраняет вызванное T₄ подавление сократительных ответов артерий икроножной мышцы на метоксамин. Зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин после инкубации артерий с удаленным эндотелием с T₄ или растворителем в отсутствие (А) или в присутствии (Б) тетрака (3 мкМ). Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0.05$ по сравнению с группой ДМСО (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

3.3.4 Влияние T₄ на уровень фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина в артериях

Основным способом регуляции сокращения гладких мышц артерий является активирующее фосфорилирование MLC2 (Воротников и др., 2009; Mizuno et al., 2008; Somlyo 2003). Фосфорилирование MLC2 может проходить по двум остаткам –Ser19 и Thr18 (Wilson et al., 2005). Нужно отметить, что механизмы фосфорилирования по остатку Ser19 более изучены, поскольку оно является необходимым условием активации миозина 2 (Казакова и др., 2019). Чтобы определить, связано ли вызванное T₄ негеномное расслабление артерий с данным механизмом, мы оценивали уровень фосфорилирования MLC2 по Ser19 в сегментах артерий после добавления растворителя, метоксамина, или метоксамина на фоне инкубации с T₄ (Рис.33). Метоксамин вызывал увеличение уровня фосфо-MLC2, тогда как предварительная инкубация с T₄ ослабляла этот прирост.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что негеномное влияние T₄ на тонус артерий связано с изменением уровня фосфорилирования легких цепей миозина.

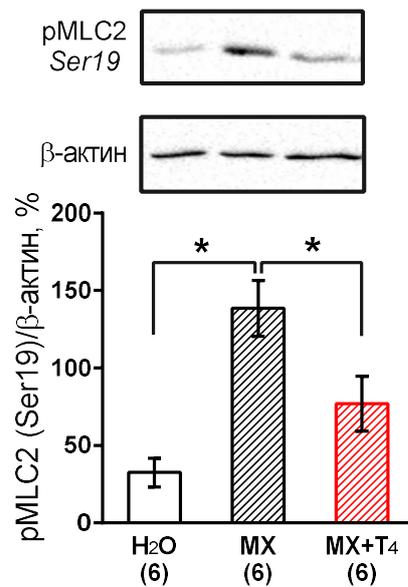


Рис.33. Т₄ ослабляет вызванный метоксамином прирост уровня фосфорилирования легких цепей миозина (pMLC2) по остатку Ser19 в артериях икроножной мышцы. Репрезентативные части мембран представлены в верхней части графика. Данные нормированы на содержание β-актина в том же образце, за 100% принято среднее значение для двух образцов артерий брыжейки, которые присутствовали на каждой мембране. MX – метоксамин (10 мкМ). Концентрация Т₄ – 10 мкМ. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. * - $p < 0.05$ (однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Даннета). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

3.3.5 Влияние блокатора кальций-зависимых калиевых каналов большой проводимости на расслабление артерий под действием Т₄

Так как интегрин $\alpha\beta_3$ не способен напрямую влиять на уровень фосфорилирования MLC2 в гладкомышечных клетках артерий, необходимо было идентифицировать других молекулярных участников, обеспечивающих передачу сигнала от интегрина к сократительному аппарату клетки. Одним из таких участников могут быть функционально важные для гладкой мышцы артерий кальций-зависимые калиевые каналы большой проводимости BK_{Ca} (Davis et al., 2002), так как их активация ведет к гиперполяризации мембраны, закрытию кальциевых каналов L-типа и снижению внутриклеточной концентрации кальция (Fan et al., 2019), в результате чего уровень фосфорилирования MLC2 может уменьшаться (Webb, 2003).

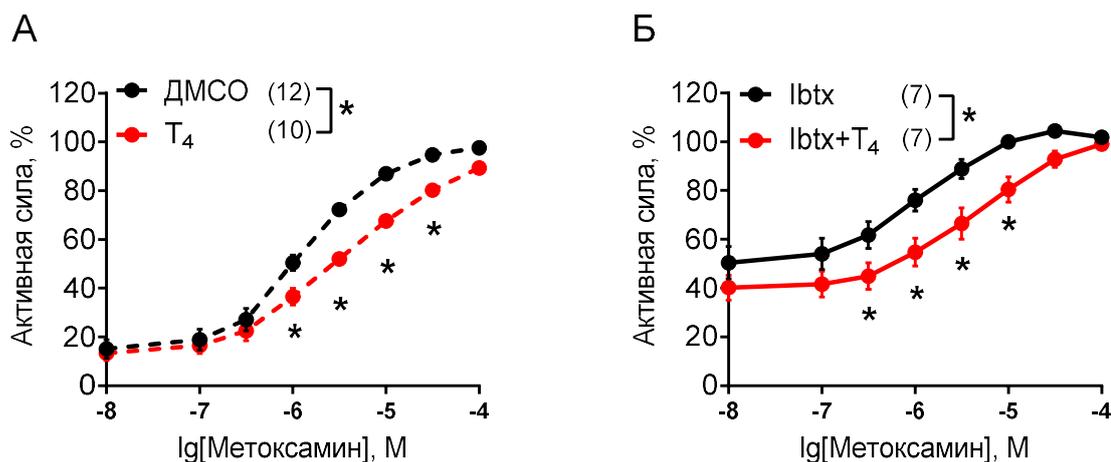


Рис 34. Блокатор ВК_{Ca} каналов ибериотоксин (Ibtx) не устраняет вызванное T₄ подавление сократительных ответов артерий икроножной мышцы на метоксамин. Зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин после инкубации артерий с удаленным эндотелием с T₄ или растворителем в отсутствии (А) или присутствии (Б) ибериотоксина (Ibtx, 0.1 мкМ). Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * - p<0.05 (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

Тем не менее, вызванное T₄ подавление сократительных ответов артерий на метоксамин наблюдалось и в присутствии блокатора ВК_{Ca} ибериотоксина (Рис.34Б). Сохранение эффекта T₄ в присутствии ибериотоксина также подтвердилось при вычислении значений площади под кривыми: T₄ вызывал уменьшение площади до 81.2±5.7% (% от группы ДМСО), тогда как T₄ на фоне ибериотоксина приводил к аналогичному уменьшению до 80.2±6.3% (% от группы Ibtx) (p>0.05, непарный критерий Стьюдента).

По всей видимости, ВК_{Ca} каналы не опосредуют негеномное влияние T₄ на артерии.

3.3.6 Влияние ингибиторов протеинкиназ ERK1/2 и ILK на расслабление артерий под действием T₄

Потенциальными посредниками, передающими сигнал от интегрин $\alpha v \beta 3$ к сократительному аппарату гладкомышечных клеток, могут быть различные протеинкиназы. В частности, к протеинкиназам, активируемым в ходе интегрина сигнализации, относятся ERK1/2 и интегрин-связанная киназа ILK (integrin-linked kinase) (Friedrich et al., 2006; Rucci et al., 2005).

T₄ не подавлял сократительные ответы артерий на метоксамин в присутствии U0126, ингибитора киназы MEK1/2, активирующей ERK1/2, тогда как на фоне его неактивного аналога

U0124 эффект T₄ был ярко выражен (Рис.35А,Б). Ингибитор протеинкиназы ILK compound22 (Cpd22) также предотвращал расслабление артерий под действием T₄, тогда как эффект T₄ сохранялся после добавления эквивалентного объема растворителя ДМСО (Рис.35В,Г). Исходя из полученных данных, можно заключить, что протеинкиназы ERK1/2 и ILK опосредуют быстрое негеномное действие T₄ на артерии.

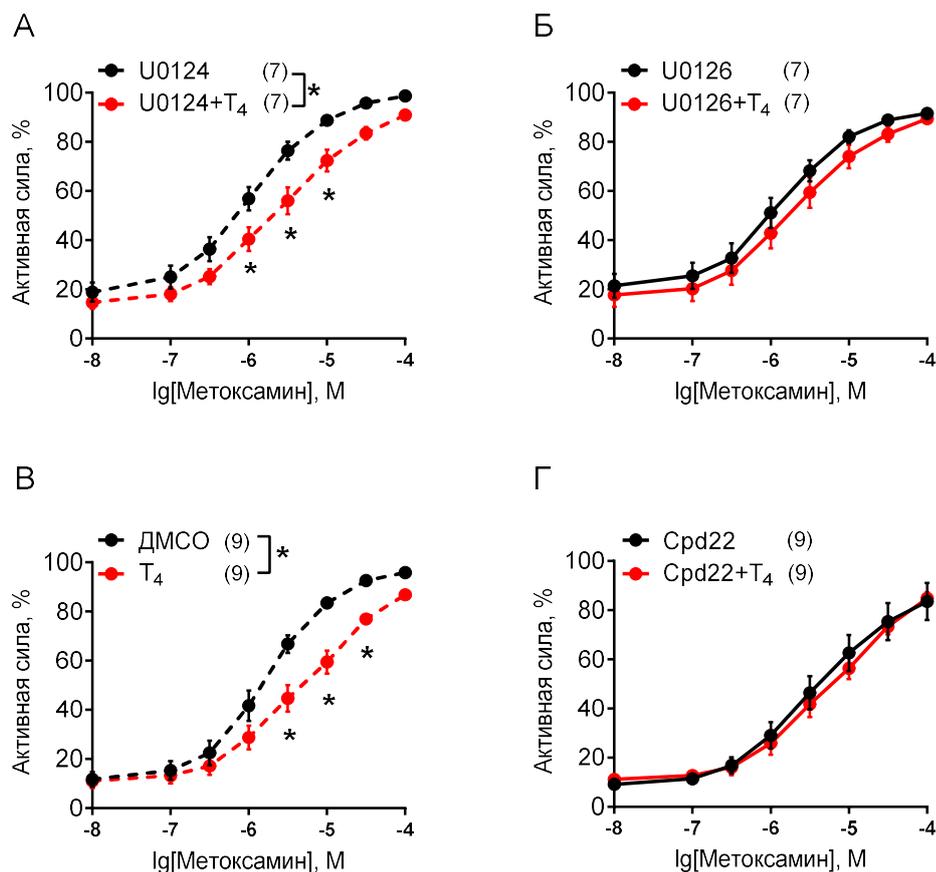


Рис.35. Ингибиторы ERK1/2 (U0126) и ILK (Cpd22) устраняют вызванное T₄ подавление сократительных ответов артерий икроножной мышцы на метоксамин. Зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин после инкубации артерий с удаленным эндотелием с T₄ или растворителем в присутствии (А) U0124 (неактивный аналог U0126, 10 мкМ), (Б) U0126 (10 мкМ), (В) ДМСО, (Г) Cpd22 (10 мкМ). Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * - $p < 0.05$ (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

3.3.7 Влияние ингибиторов Src-киназы и Rho-киназы на расслабление артерий под действием T₄

Интегрин $\alpha\beta_3$ также может активировать Src-киназу (Flamini et al., 2017; Qiu et al., 2014). Активация Src-киназы, в свою очередь, может приводить к активации Rho-киназы,

важного регулятора уровня фосфорилирования MLC2 (Knock et al., 2008; Samarakoon et al., 2011).

В наших экспериментах T_4 подавлял вызванное метоксамином сокращение артерий в присутствии как ингибитора Src-киназы PP2, так и его неактивного аналога PP3 (Рис.36А,Б). Эффект T_4 также был выражен на фоне действия ингибитора Rho-киназы Y27632 (Рис.36В,Г). Сохранение расслабляющего эффекта T_4 на артерии в присутствии ингибиторов Src- и Rho-киназ подтверждается сопоставимым изменением площади под кривой зависимости «концентрация-эффект» для метоксамина. В артериях, инкубированных с PP2 и PP3 T_4 приводил к уменьшению площади до $76.2 \pm 4.8\%$ и $77.7 \pm 5.8\%$ по сравнению с контролем, соответственно ($p > 0.05$, непарный критерий Стьюдента). Аналогично, в артериях, инкубированных с Y27632 или растворителем уменьшение площади под действием T_4 составило $68.4 \pm 4.4\%$ и $70.3 \pm 5.2\%$ по сравнению с соответствующим контролем ($p > 0.05$, непарный критерий Стьюдента).

Полученные данные свидетельствуют, что Src- и Rho-киназы не являются функционально значимыми посредниками быстрого расслабления артерий под действием T_4 .

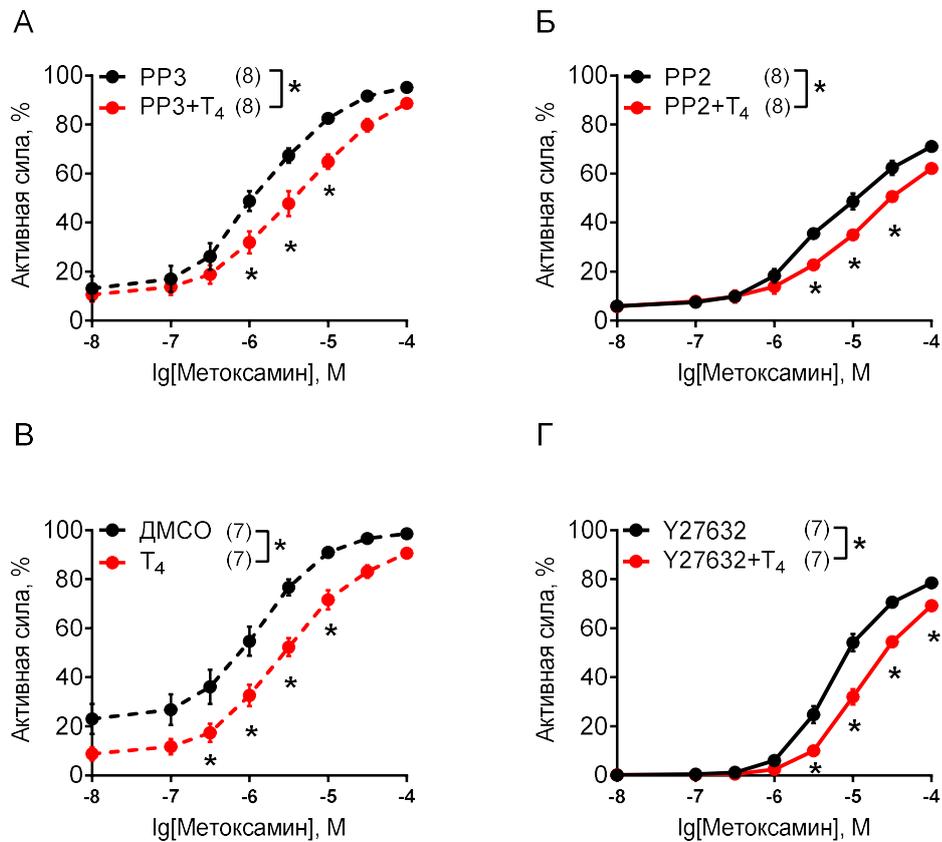


Рис.36. Ингибиторы Src- (PP2) и Rho-киназы (Y27632) не устраняют вызванное T_4 подавление сократительных ответов артерий икроножной мышцы на метоксамин. Зависимости

«концентрация-эффект» на метоксамин после инкубации артерий с удаленным эндотелием с T₄ или растворителем в присутствии (А) PP3 (неактивного аналога PP2, 10 мкМ), (Б) PP2 (10 мкМ), (В) ДМСО, (Г) Y27632 (10 мкМ). Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. * - p<0.05 (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

3.3.8 Влияние T₄ на уровень фосфорилирования протеинкиназы Akt и субъединицы фосфатазы легких цепей миозина MYPT1 в артериях

К посредникам, способным влиять на уровень фосфорилирования MLC2 и участвовать в интегринавой сигнализации, относится протеинкиназа Akt. Src-киназа и ILK могут активировать Akt (Persad et al., 2001; Yang et al., 2005). Более того, было показано, что сигнальный путь Src/PI3K/Akt может опосредовать негеномные эффекты в тканях за пределами сердечно-сосудистой системы (Cao et al., 2009; Lei 2011). Однако в наших экспериментах 20-минутная инкубация с T₄ не влияла на уровень фосфорилирования Akt по остатку Ser473 в сокращенных метоксамином артериях (Рис.37А).

Ключевым механизмом увеличения содержания фосфо-MLC2 под действием Rho-киназы является подавление активности фосфатазы легких цепей миозина путем фосфорилирования ее регуляторной субъединицы MYPT1 (myosin phosphatase target subunit 1) (Kitazawa et al., 2003; Knock et al., 2008). Поэтому для дополнительной проверки участия Rho-киназы в быстрых эффектах T₄ на артерии мы оценивали уровень фосфорилирования регуляторной субъединицы фосфатазы легких цепей миозина MYPT1 по специфическому для Rho-киназы сайту Thr850 (Grassie et al., 2011; Kitazawa et al., 2003). 20-минутная инкубация с T₄ приводила к значимому снижению содержания фосфо-MYPT1 в артериях, сокращенных метоксамином (Рис.37Б). Таким образом, можно заключить, что сигнальный каскад, инициируемый T₄ в ходе быстрого негеномного действия на артерии, не задействует протеинкиназу Akt, но может быть связан с повышением активности фосфатазы легких цепей миозина в результате фосфорилирования ее регуляторной субъединицы MYPT1.

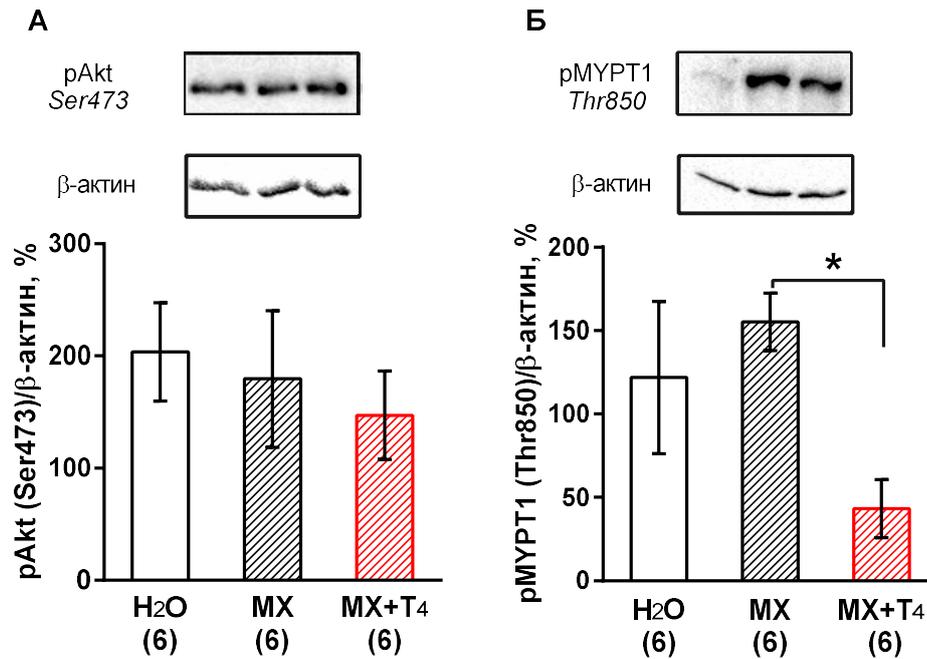


Рис 37. Влияние T₄ на уровень фосфорилирования киназы Akt по остатку Ser473 (А) и субъединицы фосфатазы легких цепей миозина MYPT1 по остатку Thr850 (Б) в артериях икроножной мышцы. Репрезентативные части мембран представлены в верхней части графика. Данные нормированы на уровень β -актина в том же образце, за 100% принято среднее значение для двух образцов артерий брыжейки, которые присутствовали на каждой мембране. MX – метоксамин (10 мкМ). Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0.05$ (однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Даннета). Числа в скобках соответствуют количеству животных в группе.

4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1 Обобщение полученных результатов

Данная работа была направлена на изучение механизмов тиреоидной регуляции резистивных артерий, причем учитывала как геномный, так и негеномный аспекты действия тиреоидных гормонов. Работу можно разделить на три этапа, которые будут последовательно рассмотрены в обсуждении:

- 1) исследование механизмов регуляции экспрессии D2 в резистивных артериях *in vivo*;
- 2) исследование функциональной роли D2 в резистивных артериях;
- 3) исследование механизмов быстрого расслабления сосудов при негеномном действии T₃ и T₄.

D2 является основным фактором, определяющим интенсивность геномного действия тиреоидных гормонов в ткани. В данной работе впервые изучена регуляция экспрессии D2 в резистивных артериях *in vivo*. Показано, что избыток T₃ приводит к снижению уровня мРНК D2 в артериях скелетных мышц. Впервые установлено, что хроническая неонатальная десимпатизация также вызывает снижение мРНК D2 в артериях скелетных мышц, но не тонкого кишечника. Показано, что хроническое подавление синтеза оксида азота не влияет на экспрессию D2 в резистивных артериях этих сосудистых регионов.

В данной работе впервые использована методика культивирования сосудов для выявления функциональной роли D2 в резистивных артериях. Показано, что ингибирование D2 сопровождается снижением регуляторного влияния оксида азота на реакции сокращения и расслабления артерий скелетных мышц.

Наконец, в работе впервые проведено комплексное исследование механизмов негеномного влияния тиреоидных гормонов на тонус артерий скелетных мышц. Показано, что эффект T₃ менее выражен, чем эффект T₄, и является эндотелий-зависимым, тогда как эффект T₄ сохраняется после удаления эндотелия. Впервые идентифицированы ключевые участники каскада, инициируемого T₄ в ходе негеномного расслабления: интегрин $\alpha\beta_3$, протеинкиназы ERK1/2 и ILK.

4.2 Механизмы регуляции экспрессии D2 *in vivo*

В данной работе впервые предпринята попытка изучить механизмы регуляции экспрессии D2 в резистивных артериях разных органов крыс *in vivo*. Для исследования механизмов были выбраны и ранее известные факторы, чья роль в регуляции экспрессии D2 была показана в исследованиях на клеточных культурах и в других тканях (концентрация уровня T₃ в крови и симпатические влияния), и ранее не изученный фактор уровня продукции NO, имеющий особое значение для работы сосудов.

4.2.1 Экспрессия D2 при гипертиреозе

Для моделирования гипертиреоза было использовано введение T₃, которое приводило к увеличению обеих фракций T₃ и снижению обеих фракций T₄ в крови. По всей видимости, такое разнонаправленное изменение тиреоидных гормонов связано с активацией петли обратной связи в гипоталамо-гипофизарной-тиреоидной оси (Bianco et al., 2019). Аналогичное разнонаправленное изменение содержания тиреоидных гормонов в крови наблюдалось при введении крысам T₃ и в другой работе (Donzelli et al., 2016).

В исследованиях на клеточных культурах и тканях вне сосудистой системы было показано, что и T₃, и T₄ могут оказывать негативное влияние на экспрессию и активность D2 (Burmeister et al., 1997; Croteau et al., 1996). Использованная нами модель гипертиреоза за счет разнонаправленного изменения концентраций T₃ и T₄ в крови позволила разделить эффекты этих двух форм тиреоидных гормонов и оценить влияние избытка традиционно считающегося более активным T₃ на экспрессию D2. Нужно отметить, что снижение концентрации T₄ в крови не повлияло на общую картину эффектов гипертиреоза на организм животных: в соответствии с данными литературы, в нашей модели у крыс наблюдалось замедление прироста массы тела и увеличение систолического артериального давления (Asahi et al., 2001; Bussemaker et al., 2003; Rodríguez-Gómez et al., 2016; Tsujimoto 1986). Гипертиреоз у людей также часто приводит к снижению массы тела и повышению систолического артериального давления (Berta et al., 2019; Klein, 1990; Kyriacou et al., 2019). Моделирование гипертиреоза при помощи введения T₄ привело бы к повышению концентрации как T₄, так и T₃ в крови (Honda et al., 2000; Quesada et al., 2002), в этом случае было бы невозможно определить собственные эффекты разных форм тиреоидных гормонов.

Избыток T₃ сопровождался снижением содержания мРНК D2 в артериях икроножной мышцы. Это согласуется с представлениями о негативном влиянии тиреоидных гормонов на экспрессию гена D2 в некоторых тканях, в том числе, в нервной ткани и скелетных мышцах (Burmeister et al., 1997; Croteau et al., 1996; Hosoi et al., 1999), а также с результатами

экспериментов на культуре гладкомышечных клеток артерий человека (Mizuma et al., 2001). Это также согласуется с представлениями о том, что T_3 влияет на экспрессию D2 именно на транскрипционном уровне (Burmeister et al., 1997).

Однако уменьшение уровня мРНК не сопровождалось снижением белка D2. Можно предположить, что наблюдаемого умеренного снижения содержания мРНК оказалось недостаточно для изменения уровня белка. Кроме того, неодинаковое влияние гипертиреоза на содержание мРНК и белка D2 может быть связано с недостатком T_4 в крови крыс, получавших инъекции T_3 . Известно, что T_4 негативно регулирует экспрессию D2 на посттранскрипционном уровне, увеличивая скорость протеасомной деградации фермента (Burmeister et al., 1997; Steinsapir et al., 1998). В условиях недостатка T_4 срок полужизни фермента увеличивается (Gereben et al., 2008), благодаря чему уровень белка D2 мог не снижаться, несмотря на уменьшение содержания мРНК.

Несмотря на высказанные предположения, полученные данные не позволяют однозначно установить причину отсутствия снижения белка D2 при гипертиреозе *in vivo*. В частности, сохранение уровня белка D2 может происходить в результате действия дополнительных факторов, изменяющихся при гипертиреозе, например, концентраций других гормонов в крови. Известно, что гипертиреоз ассоциирован с нарушениями многих гормональных систем, в том числе инсулиновой системы и гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси (Шпаков, 2017; Ajayi et al., 2013). Возможно, эти системы также оказывают влияние на уровень экспрессии D2.

Можно заключить, что подавление экспрессии D2 на уровне мРНК в артериях скелетных мышц при гипертиреозе согласуется с классическими представлениями о негативной T_3 -зависимой регуляции этого фермента в других тканях. Вопрос о тиреоидной регуляции содержания D2 в клетках сосудов должен быть более детально рассмотрен в дальнейших исследованиях, возможно, в более простых и контролируемых условиях. Одним из подходящих методических подходов может быть культивирование сосудов.

4.2.2 Экспрессия D2 при хронической неонатальной десимпатизации

Хроническая неонатальная десимпатизация не вызывала значительных изменений тиреоидного статуса крыс, но приводила к небольшому снижению свободного T_3 . Известно, что симпатические волокна иннервируют щитовидную железу, причем активация симпатической системы усиливает секрецию тиреоидных гормонов (Melandar et al., 1974). Тем не менее, в наших экспериментах наблюдалось снижение только свободного T_3 , что, скорее всего, не связано с уменьшением продукции гормонов щитовидной железой, так как тиреоциты синтезируют преимущественно T_4 (Laurberg, 1984). Показано, что неонатальное введение

гуанетидина приводит к значительному снижению содержания норадреналина во всех тканях, кроме надпочечников и мозга (Levin et al., 1984). Поскольку катехоламины способны активировать D2 в буром жире (Aceves 2001), можно предположить, что небольшое уменьшение свободного T₃ у десимпатизированных крыс связано со сниженной активностью D2 в буром жире. Было показано, что в определенных физиологических состояниях (например, после острой или хронической холодовой экспозиции), активация D2 в буром жире может способствовать значимому повышению уровня T₃ в плазме крови крыс (Silva, Larsen, 1985).

В экспериментальной модели неонатальной десимпатизации мы оценивали экспрессию D2 в резистивных артериях двух разных сосудистых регионов – скелетных мышц и тонкого кишечника. Мы предполагали, что влияние десимпатизации на содержание D2 в артериях может зависеть от плотности симпатической иннервации, поэтому выбрали густо иннервированные артерии (артерии тонкого кишечника, или брыжейки) и относительно редко иннервированные артерии (артерии икроножной мышцы, или суральные). Известно, что введение агонистов адренорецепторов вызывает увеличение содержания мРНК и активности D2 в буром жире (Jones et al., 1986) и аорте (Yasuzawa-Amano, Toyoda, 2004). Механизм транскрипционного эффекта катехоламинов связывают с увеличением внутриклеточной концентрации цАМФ и активацией транскрипционного фактора CREB (белок, связывающий цАМФ-чувствительные последовательности в ДНК), связывающегося с промотором гена D2 (Bartha et al., 2000; Gereben et al., 2008; Martinez-deMena et al., 2016).

В соответствии с этим, мы предполагали, что содержание мРНК D2 будет выше в артериях с более высокой плотностью симпатической иннервации. Тем не менее, уровень мРНК D2 был значительно выше в артериях икроножной мышцы по сравнению с артериями брыжейки. Такое различие в уровне экспрессии D2 можно объяснить разной чувствительностью артерий к агонистам β-адренорецепторов. Известно, что артерии скелетных мышц, в том числе артерии икроножной мышцы, обладают более высокой чувствительностью к агонистам β-адренорецепторов в связи с необходимостью расширения сосудов мышц при стрессе (Mark et al., 1972). Скорее всего, это означает, что плотность β-адренорецепторов в артериях икроножной мышцы выше, чем в артериях брыжейки. Более высокая плотность β-адренорецепторов может обеспечивать более высокий уровень внутриклеточного цАМФ в клетках артерий икроножной мышцы, и, как следствие, более высокое содержание в них мРНК D2, несмотря на сравнительно низкую плотность симпатической иннервации.

Кроме того, симпатические волокна, иннервирующие артерии разных сосудистых регионов, могут быть неодинаково активными (Machado, Brody, 1990). Более высокая активность волокон, иннервирующих артерии икроножной мышцы, также может быть причиной более высокого уровня мРНК D2 в ней по сравнению с артериями брыжейки. Однако

это всего лишь предположение, так как разрядную активность симпатических волокон, иннервирующих артерии скелетных мышц и кишечника, у бодрствующих крыс нельзя оценить экспериментально.

Неонатальная десимпатизация приводила к снижению мРНК D2 в артериях икроножной мышцы, но не в артериях тонкого кишечника. Отсутствие влияния десимпатизации на экспрессию D2 в артериях брыжейки можно объяснить сравнительно низким содержанием мРНК по сравнению с артериями икроножной мышцы. Возможно, в артериях брыжейки содержание мРНК D2 настолько низкое, что находится вне диапазона физиологической регуляции.

В связи с тем, что изменение мРНК D2 наблюдалось только в суральных артериях, исследования уровня белка проводили именно для них. Содержание белка D2 в артериях икроножной мышцы крыс с неонатальной десимпатизацией демонстрировало тенденцию к снижению, что согласуется с изменениями мРНК.

Таким образом, можно заключить, что экспрессия D2 в артериях положительно регулируется симпатическими влияниями, однако эта зависимость имеет регионарную специфичность и проявляется в артериях скелетных мышц, но не тонкого кишечника. Отсутствие изменений мРНК D2 в густо иннервированных артериях брыжейки при десимпатизации подразумевает наличие в них сложного взаимодействия регуляторных влияний симпатической нервной системы и других факторов на экспрессию D2 в артериях, такое взаимодействие представляет интерес для изучения в будущем. Изменение уровня мРНК D2 в суральных артериях может свидетельствовать о более высокой физиологической значимости этого фермента и тиреоидной регуляции в целом именно для сосудистого русла скелетных мышц. Это подтверждается данными о выраженном изменении кровотока в этом регионе как у людей, так и у крыс с гипертиреозом (Bausch, McAllister, 2003; Frey, 1967; Martin et al., 1992; McAllister et al., 1995).

4.2.3 Экспрессия D2 при хроническом подавлении синтеза оксида азота

В данной работе впервые исследовано влияние синтеза NO на экспрессию D2. Гипотеза о возможном негативном влиянии оксида азота на экспрессию D2 была выдвинута на основании сопоставления профилей экспрессии eNOS и D2 в артериях разных регионов: ранее в нашей лаборатории было показано, что в артериях брыжейки крыс уровень экспрессии eNOS намного выше, чем в подкожной артерии, тогда как уровень экспрессии D2 – напротив, намного ниже (Sofronova et al., 2016; Sofronova et al., 2017). В ходе данной работы мы обнаружили аналогичное соотношение экспрессии eNOS и D2 при сравнении суральных артерий и артерий брыжейки: уровень мРНК eNOS был выше в артериях брыжейки, а мРНК D2 – в артериях

икроножной мышцы крыс. Однако хроническое подавление синтеза оксида азота не привело к изменению экспрессии D2 ни в одной из исследованных артерий, причем как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Таким образом, полученные результаты не согласуются с нашей гипотезой. Возможно, уровни экспрессии D2 и eNOS находятся под регуляторным влиянием какого-то еще, на данный момент не выявленного фактора.

4.2.4 Обобщение результатов о регуляции экспрессии D2 в резистивных артериях крыс *in vivo*

Исследование механизмов регуляции экспрессии D2 в резистивных артериях крыс показало, что уровень мРНК D2 в артериях зависит от таких «классических» факторов, как концентрация T₃ в крови и симпатические влияния, которые могут модулировать экспрессию D2 в других тиреоид-чувствительных тканях, в частности, в нервной системе и буром жире. Следует отметить, что как уровень мРНК D2, так и механизмы регуляции ее экспрессии могут отличаться в сосудах разных органов. Мы также показали, что уровень экспрессии D2 в артериях не зависит от влияния такого важного вазоактивного агента как NO. В связи с этим для выявления специфических для сосудов механизмов регуляции экспрессии D2 необходимы дальнейшие исследования.

Интересно, что во всех использованных нами довольно «жестких» экспериментальных моделях происходило изменение экспрессии мРНК только D2, но не рецепторов тиреоидных гормонов. Такая лабильность уровня D2 в артериях свидетельствует о том, что именно за счет активности этого фермента происходит регуляция интенсивности действия тиреоидных гормонов на сосуды.

Эксперименты *in vivo*, позволившие нам выявить зависимость экспрессии D2 в резистивных артериях крыс от тиреоидных и симпатических влияний, тем не менее, пока не позволяют установить, какие клетки стенки сосуда являются мишенью регуляции – эндотелиальные или гладкомышечные. В работах на клеточных культурах экспрессия D2 была обнаружена в обоих типах клеток (Aoki et al., 2015; Toyoda et al., 2009). Интересно, что инкубация гладкомышечных клеток с T₃ приводила к снижению мРНК D2 (Mizuma et al., 2001), тогда как инкубация эндотелиальных клеток с T₃ не оказывала влияния на экспрессию мРНК этого фермента (Sabatino et al., 2015). Если опираться на результаты данных исследований, можно предположить, что в нашей работе уменьшение уровня мРНК D2 при гипертиреозе преимущественно происходило в гладкой мышце суральных артерий.

Следует отметить, что использование подхода *in vivo* с оценкой уровня мРНК и белка D2 при различных состояниях организма, несмотря на более физиологические условия по сравнению с экспериментами *in vitro*, ограничивает интерпретацию результатов исследований.

Это связано с тем, что хроническое введение фармакологических препаратов, необходимое для создания той или иной экспериментальной модели, приводит ко множеству изменений в работе систем органов животного, часть из которых являются вторичными по отношению к препарату. Так как экспрессия D2 зависит от многих факторов (Arrojo E Drigo et al., 2013), она может изменяться не в результате прямого транскрипционного, трансляционного или посттранскрипционного действия препарата, но в результате его опосредованного действия за счет изменения функционирования систем органов или влияния на какие-либо показатели внутренней среды. Например, изменение тиреоидного статуса может влиять на активность симпатической нервной системы. В частности, у пациентов с гипертиреозом наблюдается дисбаланс нервной регуляции сердечного ритма: усиливаются симпатические влияния и ослабляются – парасимпатические (Burggraaf et al., 2001; Chen et al., 2006). С другой стороны, в наших экспериментах хроническая десимпатизация приводила к изменению тиреоидного статуса, что проявлялось в небольшом снижении концентрации общего T₃ в крови. Поэтому следует учитывать, что выявленные нами закономерности регуляции экспрессии D2 требуют более подробного изучения в экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro* в будущем.

Также следует отметить, что в целях стандартизации результатов в работе были использованы только самцы крыс, так как использование самок сопряжено с необходимостью отслеживания их эстрального цикла, изменение продукции половых гормонов в ходе которого может влиять на реактивность артерий (Liu et al., 2001; Toba et al., 1991; Zamorano et al., 1994). Учет фазы эстрального цикла особенно сложен в хронических экспериментах, так как необходимо одновременно обеспечить и одинаковую длительность воздействия для крыс обоих полов, и одинаковую фазу цикла для самок в момент различных манипуляций (оценки артериального давления, взятия крови, выделения артерий). Тем не менее, тиреоидные дисфункции в 10-20 раз чаще встречаются у женщин, чем у мужчин (Taylor et al., 2018). Можно предположить, что обнаруженные нами закономерности тиреоидной регуляции работы сосудов будут для самок будут не менее или даже более значимыми, чем для самцов. Поэтому задача провести аналогичные эксперименты с использованием самок крыс в будущем представляется довольно актуальной.

4.3 Функциональная роль D2 в резистивных артериях

4.3.1 Влияние культивирования на характеристики артерий

Нужно отметить, что изучение функциональной роли D2 в артериях требовало использования особого методического подхода. Системное введение ингибитора 5'-дейодирования неизбежно приводит к изменению концентраций тиреоидных гормонов в крови,

а также сдвигу установочной точки тиреоидной оси в гипоталамусе (Coppola et al., 2005; Maia et al., 2005), что может повлиять на тиреоидную регуляцию артерий и затруднить интерпретацию результатов. Использование мышей с нокаутом гена D2 нерационально по тем же причинам: у них наблюдается сдвиг установочной точки тиреоидной оси в гипоталамусе. Кроме того, для нокаутных мышей характерна компенсация патологий во взрослом возрасте (Bianco et al., 2014; Galton et al., 2014).

Для обеспечения пролонгированного действия ингибитора D2 без сопутствующих системных изменений, но с возможностью последующего анализа вазомоторных реакций сосудов мы использовали методику культивирования сегментов артерий (organ culture). Эта методика обеспечивает более физиологичные условия эксперимента, чем клеточная культура, при этом позволяет минимизировать побочные эффекты от действия исследуемых веществ на другие органы, в отличие от методик *in vivo*. Она используется в том числе и при проведении доклинических исследований влияния различных веществ на сосуды (Christensen et al., 2019). Так как при добавлении в культуральную среду ингибитор 5'-дейодирования иопановая кислота накапливается в клетках (Barnhart et al., 1983), мы предположили, что при культивировании артерий она также будет способна проникать внутрь ткани и подавлять активность D2.

Предварительная серия экспериментов подтвердила возможность использования культивирования целых артерий для исследования функциональной роли D2: при культивировании в течение 8 и 24 часов не происходило уменьшения содержания мРНК D2. Содержание мРНК TR α 1 несколько снижалось, однако соотношение TR α 1/TR α 2 не изменялось, что позволяет считать умеренным наблюдаемое уменьшение чувствительности к тиреоидным гормонам.

Культивирование в течение 12 часов не приводило к значимым изменениям реакций сокращения и расслабления артерий икроножной мышцы. Адренореактивность артерий икроножной мышцы на метоксамин не отличалась от предыдущих данных, полученных в нашей лаборатории (Гайнуллина и др., 2018). Величина расслабления артерий икроножной мышцы на ацетилхолин также соответствовала данным литературы (Борзых и др., 2017). Наличие выраженного эндотелий-зависимого расслабления говорит о том, что при 12-часовом культивировании сохраняется функциональная активность эндотелия.

При этом 12-часового срока инкубации должно быть достаточно для проявления геномных эффектов тиреоидных гормонов (Bianco et al., 2014; Tamajusuku et al., 2006)

4.3.2 Активность D2 необходима для поддержания вазомоторной роли NO в артериях скелетных мышц крысы

В данной работе впервые установлена функциональная роль D2 в артериях при помощи методики культивирования. Мы показали, что культивирование с ингибитором 5'-дейодирования вызывало уменьшение влияния тонической продукции NO на вызванные метоксамином сократительные ответы артерий. Оно также приводило к снижению вклада NO в эндотелий-зависимое расслабление артерий на ацетилхолин. Исходя из этого, можно заключить, что опосредованное D2 увеличение внутриклеточного T₃ необходимо для поддержания продукции NO на уровне, необходимом для регуляции тонуса артерий.

Наличие эффекта ингибитора 5'-дейодирования на вазомоторные реакции сосудов подразумевает, что при культивировании артерий D2 продолжает быть активной. По всей видимости, после выделения в стенке артерий сохраняется некоторое остаточное количество T₄, которое в ходе инкубации подвергается превращению в T₃. Тем не менее, добавление субстрата D2 – T₄, – не вызывало дополнительного увеличения влияния NO на реакции расслабления и сокращения сосудов. С одной стороны, это может быть связано с низкой концентрацией гормона – всего 50 пМ. Она соответствует физиологической, однако при культивировании чувствительность к тиреоидным гормонам может снижаться, так как условия все же отличаются от физиологических. Кроме того, часть липофильных молекул T₄ может сорбироваться на пластике планшета для культивирования (Bianco et al., 2014). В связи с этим, в будущем целесообразно провести аналогичную серию экспериментов с использованием более высокой концентрации гормона. Возможно, для предотвращения адгезии к пластику в среду для культивирования следует добавить белок, например, альбумин, (Bianco et al., 2014). При наличии белка в составе среды часть молекул гормона будет обратимо сорбироваться на нем, высвобождаясь при снижении концентрации свободного гормона в составе среды.

Также нужно отметить, что активность D2 в условия культуры органа может быть снижена. Известно, что для работы фермента необходим тиоловый кофактор, чтобы восстанавливать Se-H группы в каталитическом центре (Gereben et al., 2008; Germain, 1988). Культивирование проводится в среде с высоким содержанием O₂, что может вызывать сдвиг окислительно-восстановительного баланса клеток в сторону меньшего содержания восстановителей. Показано, что активность дейодиназы дозозависимо увеличивается при добавлении восстановителя, например, дитиотреитола, а при нарушении окислительно-восстановительного баланса в клетке – падает (Germain, 1988). Возможно, при добавлении дитиотреитола в среду для культивирования активность D2 возрастет, и она сможет катализировать дейодирование «дополнительного» T₄.

4.3.3 Ингибирование D2 приводит к изменению экспрессии генов в артериях скелетных мышц крысы

Мы предполагаем, что изменение сосудистых реакций в ответ на ингибирование 5'-дейодирования связано с недостатком образования внутриклеточного T₃. В соответствии с этой логикой, ингибитор D2 должен вызывать уменьшение экспрессии T₃-зависимых генов. Мы анализировали экспрессию генов только на уровне мРНК, так как предполагали, что 12 часов может быть недостаточно для изменения белкового состава клеток.

Мы изучили экспрессию четырех T₃-зависимых генов – α -актина, Serca2, RyR2, NOX1 (Hartong et al., 1994; Hudecova et al., 2004; Wang, Sun, 2010). Снижение содержания мРНК под действием ингибитора 5'-дейодирования было обнаружено только у двух генов из четырех – у генов α -актина и Serca2. Известно, что Serca2 кодируется геном, содержащим три идентифицированных TRE в промоторе, что подтверждает ослабление геномного действия T₃ на уровень мРНК Serca2 в отсутствие активности D2 (Hartong et al., 1994). Насколько нам известно, в промоторе α -актина на данный момент не было обнаружено TRE, однако зависимость экспрессии этого гена от T₃ была продемонстрирована во многих тканях (Gosteli-Peter et al., 1996; Wang, Sun, 2010). Экспрессия двух других генов не отличалась от значения в контрольной группе. Отсутствие изменения в уровне мРНК лишь части T₃-зависимых генов может быть связано, во-первых, с разной чувствительностью этих генов к T₃. В промоторе разных генов может содержаться разное количество TRE, что влияет на вероятность связывания комплекса гормон-рецептор (Giammanco et al., 2020). Во-вторых, многие гены регулируются T₃ с участием других рецепторов и коактиваторов, таких как RXR. Спектр генов, регулируемых гомо- и гетеродимерами ядерных рецепторов тиреоидных гормонов, несколько отличается. Недостаток коактиваторов и рецепторов может привести к тому, что T₃ будет стимулировать экспрессию только некоторых из потенциально зависимых от него генов, например, транскрипция которых зависит от образования гомо-, но не гетеродимеров ядерных рецепторов (Anyetei-Anum et al., 2018; Diallo et al., 2007). В этом случае ингибирование 5'-дейодирования также будет снижать экспрессию только некоторых из T₃-зависимых генов.

Ингибитор 5'-дейодирования приводил к подавлению экспрессии мРНК D2. Насколько нам известно, такое действие иопаноевой кислоты не было показано ранее. Можно предположить, что этот негативный эффект на экспрессию D2 является вторичным и опосредован другим геном, чью экспрессию изменила иопаноевая кислота. Транскриптомный анализ показал, что существует около 10 дейодиназоспецифичных генов, то есть генов, содержание мРНК которых изменяется в присутствии различных ингибиторов D2 или в клетках с нокдауном дейодиназы, но не под действием T₃ (Song et al., 2013).

Изменение вклада оксида азота в реакции сосудов предполагало изменение экспрессии NO-синтаз, в первую очередь – eNOS. На данный момент неизвестно, можно ли считать eNOS классическим T₃-зависимым геном, так как TRE в составе промотора не обнаружен, однако экспрессия eNOS, а также продукция NO при гипо- и гипертиреозе значимо разнонаправленно меняются во многих тканях (Castro de et al., 2015; Quesada et al., 2002; Rodríguez-Gómez et al., 2016; Yousefzadeh et al., 2021). Тем не менее, ингибитор 5'-дейодирования не влиял на содержание мРНК eNOS, но вызывал уменьшение экспрессии другой изоформы – iNOS. Это наблюдение согласуется с данными о снижении и увеличении содержания белка iNOS в аорте крыс при гипо- и гипертиреозе, соответственно (Yousefzadeh et al., 2021) Изменение продукции NO, опосредованное iNOS, может быть одной из причин ослабления тонического влияния NO на сократительные ответы сосудов, культивированных с ингибитором D2.

Однако следует отметить, что повышение продукции NO при эндотелий-зависимом расслаблении на ацетилхолин связано с Ca²⁺-зависимой активацией именно eNOS (Гайнуллина и др., 2013; Chataigneau et al., 1999). По-видимому, наблюдаемый на функциональном уровне дефицит влияния NO на реакции артерий связан не только со снижением экспрессии iNOS, но и с посттрансляционной модификацией eNOS, например, сайт-специфическим фосфорилированием. В данном случае приходится предполагать негеномное действие T₃. Было показано, что T₃ может увеличивать фосфорилирование eNOS в культуре эндотелиальных клеток в течение нескольких минут после аппликации за счет связывания с рецептором TRa1 и PI3K в цитоплазме (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, T₃, продуцируемый D2, стимулирует продукцию NO в артериях за счет как геномного (увеличения экспрессии iNOS), так и негеномного (увеличение активирующего фосфорилирования eNOS) механизмов действия. Активность D2 также необходима для поддержания уровня мРНК T₃-зависимых генов в артериях крыс, в частности генов, кодирующих белки сократительного аппарата – гладкомышечного α-актина и кальциевого насоса Serca2.

4.4 Негеномное действие тиреоидных гормонов на тонус артерий икроножной мышцы

4.4.1 T₃ и T₄ вызывают быстрое расслабление артерий икроножной мышцы

В данной работе впервые показано, что T₃ и T₄ способны вызывать быстрое расслабление резистивных артерий скелетных мышц. Ранее такое влияние было показано

только для артериол скелетных мышц (диаметр около 100 мкм) (Park et al., 1997), в остальном быстрые реакции мышечных сосудов данного региона на введение тиреоидных гормонов оставались неисследованными. Нужно отметить, что развитие и сократительная активность скелетных мышц, а также их кровоснабжение зависят от тиреоидного статуса организма (Bausch, McAllister, 2003; McAllister et al., 1995; McAllister et al., 1995; Salvatore et al., 2014), что может говорить о физиологической значимости вазомоторного влияния T_3 и T_4 .

Снижение тонуса предсокращенных артерий развивалось уже через несколько минут после аппликации тиреоидных гормонов, как видно на оригинальной записи на рис.30, а подавление сократительных ответов на метоксамин - после 20-минутной инкубации с T_3 или T_4 . Быстрое развитие эффекта позволяет предположить негеномный механизм его реализации, так как изменение транскрипции – гораздо более длительный процесс. К примеру, в исследованиях влияния T_3 на экспрессию мРНК в культуре гладкомышечных клеток сосудов эффект гормона наблюдается через четыре и более часов после его добавления (Kasahara et al., 2006; Tamajusuku et al., 2006).

Дилатирующее негеномное действие тиреоидных гормонов ранее было обнаружено в других регионах сосудистого русла, в том числе в крупных магистральных артериях (аорта, бедренная артерия), более мелких артериях тонкого кишечника, а также в сосудах сердца (Cai et al., 2015; Geist et al., 2021; Lozano-Cuenca et al., 2016; Yoneda et al., 1998; Zwaveling et al., 1997). Распространенность эффекта в сосудистом русле дополнительно подтверждает его физиологическую значимость. Тем не менее, в нашей и большинстве других работ тиреоидные гормоны способны вызывать расслабление в концентрациях, значительно превышающих их концентрацию в крови (Cai et al., 2015; Carrillo-Sepulveda et al., 2010; Gaynullina et al., 2018; Lozano-Cuenca et al., 2016; Zwaveling et al., 1997). Нужно отметить, что во всех этих работах регистрировали ответы артерий в изометрическом режиме, когда силу сокращения измеряют при постоянном диаметре (техника *wire myograph*). Показано, что при таком способе регистрации чувствительность препаратов к различным агонистам значительно ниже, чем при изобарических условиях (техника *pressure myograph*) (Buus et al., 1994; Dunn et al., 1994). В случае сократительного ответа на норадреналин различие в чувствительности может достигать нескольких порядков: EC_{50} (концентрация агониста, вызывающая полумаксимальный ответ) для артерий тонкого кишечника кролика составила 1 мкМ при измерении в изометрическом режиме, и 0.03 мкМ – в изобарическом режиме (Dunn et al., 1994). Считается, что такая разница обусловлена тем, что условия сокращения сосудов в изобарическом режиме более приближены к физиологическим (Wenceslau et al., 2021). Возможно, чувствительность артерий к тиреоидным гормонам также занижена при регистрации ответов в системе *wire myograph*. Эта гипотеза подтверждается тем, что при исследовании влияния тиреоидных гормонов на сосуды в более

физиологических условиях (коронарная перфузия, регистрация диаметра сосудов *in vivo*) эффект наблюдается при более близких к физиологическим концентрациях: в диапазоне 10-100 нМ (Colantuoni et al., 2005; Yoneda et al., 1998). Более того, в экспериментах по регистрации кровотока в предплечье у людей острое введение T_3 вызывало значимое увеличение кровотока, когда концентрация свободного T_3 в крови увеличивалась лишь до 15 пМ, что соответствует значению при умеренном гипертиреозе (Lin et al., 2020; Napoli et al., 2007). Стоит отметить, что на более дистальном участке сосудистого русла – на уровне артериол, – T_3 может вызывать расслабление в концентрациях, близких к физиологическим – 0.1 – 100 нМ (Park et al., 1997). Таким образом, негеномное влияние тиреоидных гормонов может быть одним из механизмов снижения сопротивления сосудов, который при эутиреоидном статусе организма в основном важен для регуляции тонуса артериол, а при гипертиреозе может проявляться и на уровне более крупных сосудов.

Несмотря на то, что изометрические условия могут изменять выраженность вазомоторных реакций, в том числе чувствительность артерий к тиреоидным гормонам, методика *wire myograph* используется в подавляющем большинстве экспериментов на изолированных сосудах. Во-первых, общая направленность изменений под действием агонистов одинакова при изометрической и изобарической регистрации. Во-вторых, в *wire myograph* спонтанная активность сосудов (реакции сокращения или расслабления в отсутствие агонистов) менее выражена (Wenceslau et al., 2021), что облегчает анализ результатов. В-третьих, с использованием многоканальной системы *wire myograph* можно одновременно исследовать несколько сегментов артерии от одного животного в разных условиях (добавление различных блокаторов). Это позволяет уменьшить вариабельность результатов при исследовании механизмов релаксирующего действия T_3 или T_4 , и снизить количество животных, необходимых для выявления эффекта. Тем не менее, безусловно, исследование негеномных дилататорных эффектов тиреоидных гормонов в изобарическом режиме представляет интерес в будущем.

4.4.2 Расслабление артерий под влиянием T_3 и T_4 опосредовано разными механизмами

В наших экспериментах T_4 вызывал более выраженное расслабление артерий скелетных мышц, чем T_3 . Аналогичное наблюдение было сделано в артериях тонкого кишечника (Zwaveling et al., 1997), тогда как в артериолах скелетных мышц влияние T_3 было более выраженным, чем T_4 (Park et al., 1997). В коронарных артериях обе формы гормона были одинаково эффективны (Yoneda et al., 1998). Такое несоответствие результатов разных работ

может быть связано с различиями рецепторов и сигнальных путей, опосредующих вызванное T_3 или T_4 негеномное расслабление в разных регионах сосудистого русла.

Действительно, мы обнаружили, что, по крайней мере, в артериях скелетных мышц механизмы негеномного действия T_3 и T_4 отличаются. Эффект T_3 оказался эндотелий-зависимым, как и в аорте (Lozano-Cuenca et al., 2016), артериях тонкого кишечника (Geist et al., 2021) и артериолах скелетных мышц (Park et al., 1997). В предыдущих работах были предприняты попытки охарактеризовать механизмы эндотелий-зависимого действия T_3 . Инкубация с ингибитором NO-синтаз L-NNA подавляла вызванное T_3 расслабление артерий и артериол (Colantuoni et al., 2005; Geist et al., 2021; Lozano-Cuenca et al., 2016; Park et al., 1997). В исследованиях на культуре эндотелиальных клеток было показано, что T_3 способен связываться с рецептором $TR\alpha 1$ в цитоплазме и активировать сигнальный каскад PI3K/Akt (Aoki et al., 2015; Hiroi et al., 2006), в результате чего происходит фосфорилирование eNOS и увеличение продукции NO (Hiroi et al., 2006; Samuel et al., 2017). Более того, этот механизм был косвенно подтвержден исследованиями *in vivo*. Болюсное введение 500 нг T_3 мышам приводило к резкому снижению артериального давления в течение 5 минут после инъекции, тогда как у мышей с нокаутом гена eNOS или $TR\alpha 1$ артериальное давление не изменялось (Geist et al., 2021; Hiroi et al., 2006). При этом у мышей с мутантными $TR\alpha 1$, не способными связываться с ДНК, сохранялась депрессорная реакция артериального давления на T_3 (Geist et al., 2021).

Нужно отметить, что в некоторых исследованиях было обнаружено независимое от эндотелия действие T_3 (Cai et al., 2015; Carrillo-Sepulveda et al., 2010), которое также связывали с усилением продукции оксида азота, но в гладкомышечных клетках (Carrillo-Sepulveda et al., 2010; Samuel et al., 2017). Так как в нашей работе эффект T_3 на артерии с удаленным эндотелием полностью отсутствовал, можно предположить, что для гладкомышечных клеток артерий скелетных мышц такой механизм действия T_3 не характерен.

В отличие от T_3 , T_4 вызывал расслабление артерий икроножной мышцы по независимому от эндотелия механизму. Так как традиционно T_4 считается менее активной формой тиреоидных гормонов, чем T_3 , исследования механизмов вызванного T_4 негеномного расслабления артерий практически не проводились (таблица 2). Насколько нам известно, лишь в одном исследовании было показано, что в артериях брыжейки T_4 был способен вызывать расслабление вне зависимости от наличия эндотелия (Zwaveling et al., 1997), что согласуется с нашими данными. При этом ни рецепторы, ни внутриклеточные сигнальные пути, опосредующие действие T_4 на гладкомышечные клетки сосудов, не были исследованы.

4.4.3 Расслабление артерий под действием T₄ опосредовано интегрином $\alpha v\beta 3$, ERK1/2 и ILK, но не ВК_{Ca}, Akt, Src- и Rho-киназой

Мы впервые показали, что эндотелий-независимое расслабление артерий под действием T₄ опосредовано интегрином $\alpha v\beta 3$, так как эффект гормона не проявлялся в присутствии тетрака, который блокирует связывание тиреоидных гормонов с интегрином (Bergh et al., 2005). Интегрин $\alpha v\beta 3$ содержит два сайта, с которыми могут связываться тиреоидные гормоны – S1 и S2, при этом аффинность T₄ к сайту S2 выше, чем у T₃ (Bergh et al., 2005; Lin et al., 2009). Ранее было показано, что интегрин $\alpha v\beta 3$ опосредует негеномные эффекты T₃ и T₄ на ангиогенез (Balzan et al., 2013; Liu et al., 2014), а также на экспрессию транспортеров аргинина и eNOS (последнее – при длительной инкубации с гормонами) (Toral et al., 2018). Однако роль интегрин $\alpha v\beta 3$ как посредника вазомоторного влияния тиреоидных гормонов ранее не была исследована.

Экспрессия интегрин $\alpha v\beta 3$ наблюдается как в эндотелиальных, так и гладкомышечных клетках сосудов (Belmadani et al., 2008; Daeichin et al., 2016; Jenkins et al., 2019). Так как T₄ вызывал расслабление артерий вне зависимости от наличия эндотелия, мы считаем, что связывание именно с интегрином гладкомышечных клеток является необходимым условием запуска внутриклеточного сигнального каскада. В связи с тем, что эффект T₃ отсутствовал в артериях без эндотелия, можно предположить, что негеномное расслабление под действием T₄ опосредует сайт S2, обладающий более высоким сродством к этой форме гормона (Lin et al., 2009).

В ходе дальнейшего исследования механизма негеномного действия T₄ мы обнаружили, что гормон уменьшает вызванный метоксамином прирост фосфорилирования MLC2 (Ser19), то есть наблюдаемое расслабление связано с регуляцией сокращения гладкой мышцы по миозиновому типу. Следует отметить, что изменение уровня фосфорилирования MLC2 по сайту Ser19 считается ключевым механизмом регуляции моторной активности миозина гладких мышц (Воротников и др., 2009; Somlyo, Somlyo, 2003; Webb, 2003). В связи с этим были сформулированы следующие критерии поиска других молекулярных участников, опосредующих эффект T₄ в гладкой мышце:

- 1) наличие функциональной связи с интегрином $\alpha v\beta 3$;
- 2) способность напрямую или опосредованно влиять на уровень фосфорилирования MLC2 (Ser19).

Существует множество сигнальных каскадов, удовлетворяющих обоим критериям. Можно условно разделить их на каскады, влияющие на активность различных ионных каналов и концентрацию ионов кальция в цитоплазме клетки (Davis et al., 2002; Gui et al., 2010), и на

протеинкиназные каскады, регулирующие кальций-чувствительность сокращения гладкой мышцы (Dwivedi et al., 2008; Knock et al., 2008; MacKenna et al., 1998).

Одними из наиболее функционально значимых ионных каналов гладкой мышцы являются VK_{Ca} , при активации которых происходит гиперполяризация мембраны, снижение внутриклеточной концентрации кальция и уменьшение степени фосфорилирования MLC2 (Fan et al., 2019). По данным литературы, лиганд интегрин $\alpha\beta3$ витронектин при инкубации с эндотелиальными клетками активирует VK_{Ca} (Gui et al., 2010). Так как в наших экспериментах ибериотоксин, ингибитор VK_{Ca} , не подавлял эффект T_4 , по-видимому, эти каналы не участвуют в сигнальном пути $T_4/\alpha\beta3/MLC2$, по крайней мере, в гладкомышечных клетках артерии икроножной мышцы.

Ингибиторный анализ сигнальных путей протеинкиназ показал, что в реализации эффекта T_4 принимают участие киназы ERK1/2 и ILK. Нужно отметить, что киназы были проанализированы в отдельных экспериментах, что не позволяет определить порядок их активации под действием T_4 . Тем не менее, можно предположить, что они расположены в сигнальном каскаде в следующем порядке: $T_4/\alpha\beta3/ERK1/2/ILK/MLC2$. Это предположение основано на том, что именно ILK способна влиять на степень фосфорилирования MLC2 (Deng et al., 2001; Murányi et al., 2002; 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 висцеральных гладких мышцах (Harnett et al., 2005; Ihara et al., 2007).

Эффект T_4 сохранялся в присутствии ингибитора Src-киназы, что означает, что ее сигнальный путь не участвует в инициируемом гормоном каскаде. Еще одним возможным посредником связанного с интегрином сигнального каскада могла быть протеинкиназа Akt (протеинкиназа B), которая может активироваться под действием Src (Lei, Ingbar, 2011) или ILK (Persad et al., 2001). Однако участие Akt в исследованном нами каскаде также не подтвердилось: T_4 не влиял на уровень фосфорилирования Akt (Ser473).

Эффект T_4 сохранялся в присутствии ингибитора Rho-киназы, что означает, что активность данной киназы не является необходимым условием для негеномного действия гормона. Однако мы обнаружили, что T_4 значительно снижает уровень фосфорилирования MYPT1 по специфическому для Rho-киназы инактивирующему сайту Thr850 (Grassie et al., 2011; Kitazawa et al., 2003). Можно предположить, что активность сигнального пути Rho-киназы под действием T_4 снижается, однако это не оказывает значимого влияния на функциональном уровне, например, из-за того, что активность фосфатазы легких цепей миозина уже сильно снижена. Активность фосфатазы при действии T_4 может снижаться под действием ILK: эта киназа способна фосфорилировать как MYPT1 (сайты Thr709, Thr695, Thr495), так и ингибиторы фосфатазы CPI-17 и PHI-1 (Deng et al., 2002; Murányi et al., 2002).

4.4.4 Вызванное T₄ расслабление артерий связано с подавлением интегриновой сигнализации в гладкомышечных клетках сосудов

Результаты данной работы свидетельствуют о том, что в реализации вызванного T₄ расслабления участвуют интегрин $\alpha\beta_3$, протеинкиназы ERK1/2 и ILK. Согласно данным литературы, протеинкиназы ERK1/2 и ILK являются проконтрактивными, то есть усиливают сокращение гладкомышечных клеток (D'Angelo, Adam, 2002; Gaynullina et al., 2021; Ihara et al., 2007). В соответствии с этим, мы предполагаем, что T₄ в ходе негеномного действия подавляет активность ERK1/2 и ILK.

Гипотетический механизм действия T₄ представлен на рис. 38. В наших экспериментах T₄ вызывал расслабление артерий на фоне агониста α_1 -адренорецепторов метоксамина. Когда гладкомышечные клетки сокращаются в ответ на агонист α_1 -адренорецепторов, происходит увеличение натяжения сосудистой стенки (Takamizawa et al., 1992), что приводит к изменению взаимодействия между внеклеточным матриксом и интегринами мембраны (Hill, Meininger, 2012). Интегрин $\alpha\beta_3$ активируется в ответ на натяжение внутриклеточного матрикса и запускает сигнальный каскад снаружи-внутри (outside-in) (Chen et al., 2017; Zeller et al., 2013). Одним из последствий активации такого каскада может быть активация ERK1/2 (Zeller et al., 2013). В гладкомышечных клетках в результате outside-in интегриновой сигнализации также происходит увеличение фосфо-MLC2 (Polte et al., 2004).

Известно, что сайт связывания T₄ с интегрином $\alpha\beta_3$ частично перекрывается с местом связывания внеклеточного матрикса (Cody et al., 2007; Freindorf et al., 2012). Мы предполагаем, что присоединение T₄ к интегрину ослабит его взаимодействие с матриксом, и, таким образом, уменьшит интенсивность посылаемого им внутрь клетки проконтрактивного сигнала.

Нужно отметить, что предложенный механизм негеномного действия T₄ на артерии икроножной мышцы базируется в основном на данных функциональных исследований, в дальнейшем он должен получить подтверждение в молекулярно-биологических исследованиях. В частности, необходимо подтвердить, что взаимодействие T₄ с интегрином $\alpha\beta_3$ снижает уровень фосфорилирования и активность ERK1/2. Кроме того, нужно определить, каким образом ILK влияет на сокращение гладкомышечных клеток – путем изменения фосфорилирования фосфатазы легких цепей миозина, ее ингибиторов или за счет прямого фосфорилирования MLC2.

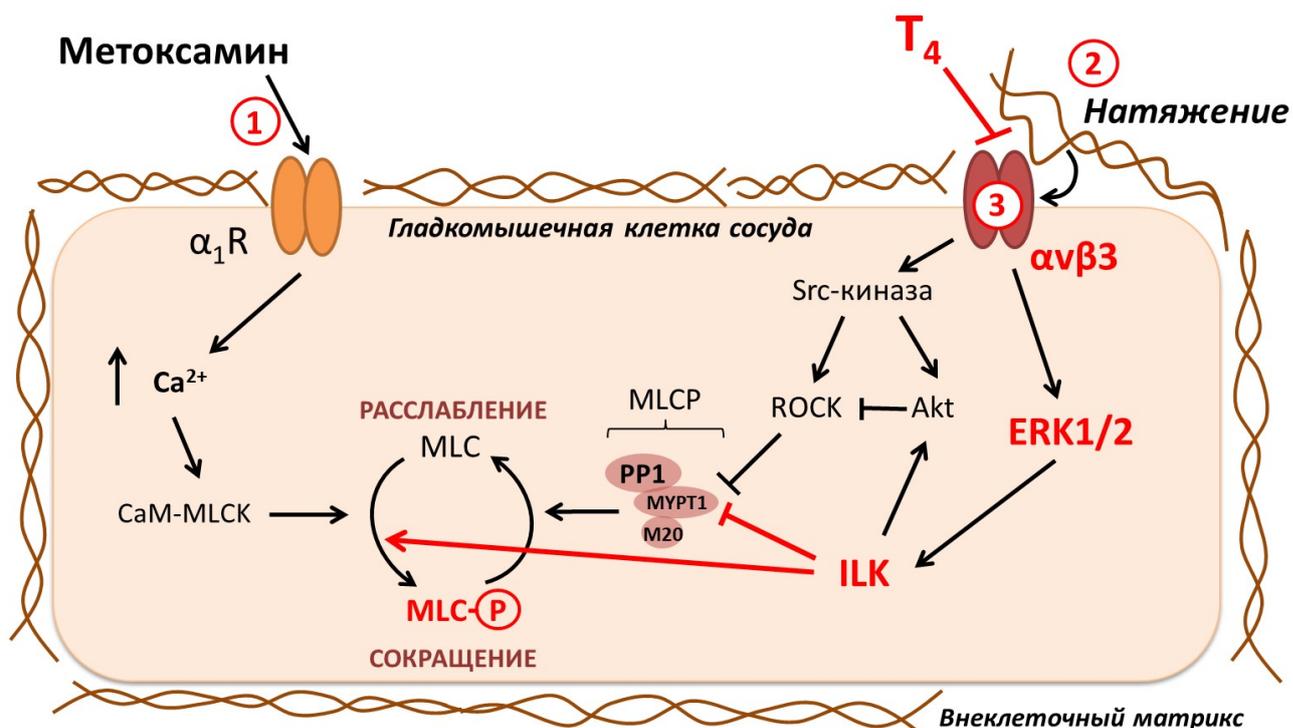


Рис. 38. Возможные сигнальные пути, опосредующие негеномное расслабление гладкомышечных клеток артерий скелетных мышц под действием T_4 . T_4 вызывает независимое от эндотелия расслабление за счет подавления интегриновой сигнализации в ответ на растяжение внеклеточного матрикса. 1 – сокращение в ответ на агонист α_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. α_1R – α_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.

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 T₃ в крови и симпатических влияний, но не зависит от уровня продукции NO. Нужно отметить, что мы выявили регионарную специфичность изменения экспрессии D2 в ответ на снижение плотности симпатической иннервации, что предполагает более высокую зависимость от тиреоидной регуляции артерий скелетных мышц по сравнению с артериями тонкого кишечника. 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 смогли установить функциональную роль T₃, образованного под действием D2, в артериях *in vitro*. Мы показали, что активность D2 необходима для NO-зависимой регуляции тонуса артерий скелетных мышц за счет стимуляции превращения T₄ в T₃. Поддержание необходимого уровня NO обеспечивается геномным механизмом T₃-зависимой регуляции экспрессии iNOS и, вероятно, негеномным T₃-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 негеномное действие тиреоидных гормонов на тонус артерий икроножной мышцы крыс и идентифицировали ключевых участников сигнального каскада, опосредующего релаксирующее влияние T₄ на гладкомышечные клетки сосудов и объяснили полученные результаты гипотезой о влиянии T₄ на систему механотрансдукции в гладкомышечных клетках. Эти результаты существенно развивают современные представления о механизмах негеномного влияния тиреоидных гормонов. Следует отметить, что концентрация T₄ в крови во много раз выше, чем T₃ (Gaynullina et al., 2018; Ortiga-Carvalho et al., 2016), что предполагает большую физиологическую значимость быстрого негеномного вазомоторного влияния T₄. В частности, обнаруженный нами эффект T₄ может вносить вклад в снижение периферического сопротивления сосудов, наблюдаемого при гипертиреозе (Klein, 1990).

В целом можно заключить, что комплексное исследование тиреоидной регуляции резистивных артерий крыс, проведенное в рамках данной работы, продемонстрировало, 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 TR 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 между геномными и негеномными эффектами T_3 и T_4 , направленными 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. Далее, 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 интегрина $\alpha v\beta 3$, а также протеинкиназ ERK1/2 и ILK и связано с уменьшением уровня фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина по остатку Ser19.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ТТГ – тиреотропный гормон

T₂ – дийодтиронин

T₃ – трийодотиронин

T₃S – сульфатированный T₃

T₄ – тироксин

Тетрак – тетраiodотироуксусная кислота

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

цАМФ – циклический аденозин монофосфат

AUC (area under curve) – площадь под кривой

CaM – кальмодулин

CRE (cAMP response element) – цАМФ-чувствительный элемент

CREB (cAMP response element binding protein) – белок, связывающий цАМФ-чувствительные последовательности

d100 – диаметр артерии при давлении 100 мм рт.ст.

D1 – дейодиназа 1 типа

D2 – дейодиназа 2 типа

D3 – дейодиназа 3 типа

DEA-NO (diethylamine NONOate) – диэтиламин NONOat

EC₅₀ – концентрация агониста, вызывающая полумаксимальный ответ

ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) – киназы, регулируемые внеклеточными сигналами

eNOS (endothelial NO-synthase) – эндотелиальная синтаза оксида азота

GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) – молекула межклеточной адгезии-1

ILK (integrin-linked kinase) – интегрин-зависимая киназа

iNOS (inducible NO-synthase) – индуцибельная синтаза оксида азота

IOP (iopanoic acid) – иопановая кислота

LAT1 (L-type amino acid transporter 1) – транспортер больших нейтральных аминокислот 1

LAT2 (L-type amino acid transporter 2) – транспортер больших нейтральных аминокислот 2

L-NNA (N^o-Nitro-L-arginine) – N-нитро-L-аргинин

L-NAME (N^o-Nitro-L-arginine methyl ester) – метиловый эфир N^o-нитро-L-аргинина

M20 – субъединица фосфатазы легких цепей миозина,

MCT8 (monocarboxylate transporter 8) – монокарбоксилатный транспортер 8

MCT10 (monocarboxylate transporter 10) – монокарбоксилатный транспортер 10
MLC2 (myosin light chain) – регуляторные легкие цепи миозина 2
MLCK (myosin light chain kinase) – киназа легких цепей миозина
MLCP (myosin light chain phosphatase) – фосфатаза легких цепей миозина
МХ – метоксамин
МУРТ1 – субъединица фосфатазы легких цепей миозина,
nNOS (neuronal NO-synthase) – нейрональная синтаза оксида азота
OATP1C1 (organic anion transporter) – транспортер органических анионов 1С1
PCNA (proliferating cell nuclear antigen) – ядерный антиген пролиферирующих клеток
PI3K (phosphoinositide-3-kinase) – фосфоинозитид-3-киназа
PKG (protein kinase G) – протеинкиназа G
PP1 – субъединица фосфатазы легких цепей миозина,
ROCK – Rho-киназа
rT₃ – реверсивный Т₃
RXR (retinoid X receptor) – ретиноидный X-рецептор
RyR2 (ryanodine receptor 2) – рианодиновые рецепторы 2 типа
SDS (sodium dodecyl sulfate) – додецилсульфат натрия
TNF α (tumor necrosis factor alpha) – фактор некроза опухолей α
TR (thyroid hormone receptor) – ядерные рецепторы тиреоидных гормонов
TRE (thyroid response element) – тиреоид-чувствительный элемент

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борзых А. А., Андреев-Андриевский А. А., Каленчук В. У., Мочалов С. В., Буравков С. В., Кузьмин И. В., Боровик А. С., Виноградова О. Л., Тарасова О. С. Стратегии адаптации мелких артерий диафрагмы и икроножной мышцы к аэробной физической нагрузке // Физиология человека. - 2017. - Т. 43. - № 4. - С. 94–102.
2. Борзых А. А., Селиванова Е. К., Швецова А. А., Кузьмин И. В., Мартыянов А. А., Нестеренко А. М., Тарасова О. С. Изменение экспрессии генов-регуляторов кальциевого гомеостаза в миокарде крысы при произвольной беговой тренировке в колесе: роль тиреоидных гормонов // Биологические мембраны Журнал мембранной и клеточной биологии. - 2020. - Т. 37. - № 1. - С. 53–60.
3. Воротников А. В., Щербакова О. В., Кудряшова Т. В., Тарасова О. С., Ширинский В. П., Пфитцер Г., Ткачук В. А. Фосфорилирование миозина как основной путь регуляции сокращения гладких мышц // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. - 2009. - Т. 95. - № 10. - С. 930–948.
4. Гайнуллина Д. К., Кирюхина О. О., Тарасова О. С. Оксид азота в эндотелии сосудов: регуляция продукции и механизмы действия // Успехи физиологических наук. - 2013. - Т. 44. - № 4. - С. 88–102.
5. 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. - 2018. - Т. 17. - № 4. - С. 23–32.
6. Исаков Е.Б. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний // Медицина и экология. - 2017. - № 2. - С. 19–28.
7. Казакова О. А., Хапчаев А. Ю., Рагимов А. А., Салимов Э. Л., Ширинский В. П. Метод иммуноблоттинга для количественного измерения уровня фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина II в небольших количествах немышечных клеток // Биохимия. - 2019. - Т. 84. - № 1. - С. 74–84.
8. Родионов И. М., Ярыгин В. Н., Мухаммедов А.А. Иммунологическая и химическая десимпатизация. Москва: Наука, 1988. - 149 С.
9. Селиванова Е. К., Тарасова О. С. Негеномное действие тиреоидных гормонов: роль в регуляции сосудистой системы // Вестник московского университета. Серия 16. Биология. - 2020. - Т. 75. - № 4. - С. 226–236.
10. Трошина Е. А., Платонова Н. М., Панфилова Е. А. Динамика эпидемиологических показателей тиреоидной патологии у населения Российской Федерации: аналитический

- отчет за период 2009 – 2018 гг // Проблемы эндокринологии. - 2021. - Т. 67. - № 2. - С. 10–19.
11. Шальнова С., Конради А., Карпов Ю., Концевая А., Деев А., Капустина А., Худяков М., Шляхто Е., Бойцов С. Анализ смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в 12 регионах российской федерации, участвующих в исследовании «эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах россии» // Российский кардиологический журнал. - 2012. - Т. 5. - № 97. - С. 6–11.
 12. Шпаков А. О. Взаимосвязь между тиреоидной патологией и сахарным диабетом 2-го типа // Трансляционная медицина. - 2017. - Т. 4. - № 2. - С. 29–39.
 13. Aceves C., Rojas-Huidobro R. Effect of suckling and adrenergic stimulation on peripheral deiodination in lactating rats: Differential expression of type 1 deiodinase mRNA forms // J. Endocrinol. - 2001. - V. 171. - № 3. - P. 533–540.
 14. Ahlersová E., Ahlers I., Smajda B. Influence of light regimen and the time of year on circadian oscillations of thyroid hormones in rats. // Physiol. Res. - 1991. - V. 40. - № 3. - P. 305–315.
 15. Ajayi A. F., Akhigbe R. E., Ajayi L. O. Hypothalamic-pituitary-ovarian axis in thyroid dysfunction // West Indian Med. J. - 2013. - V. 62. - № 9. - P. 835–838.
 16. Akerblom I. E., Slater E. P., Beato M., Baxter J. D., Mellon P. L. Negative regulation by glucocorticoids through interference with a cAMP responsive enhancer // Science. - 1988. - V. 241. - № 4863. - P. 350–353.
 17. Anyetei-Anum C. S., Roggero V. R., Allison L. A. Thyroid hormone receptor localization in target tissues // J. Endocrinol. - 2018. - V. 237. - № 1. - P. R19–R34.
 18. Aoki T., Tsunekawa K., Araki O., Ogiwara T., Nara M., Sumino H., Kimura T., Murakami M. Type 2 iodothyronine deiodinase activity is required for rapid stimulation of PI3K by thyroxine in human umbilical vein endothelial cells // Endocrinology. - 2015. - V. 156. - № 11. - P. 4312–24.
 19. Arai M., Otsu K., MacLennan D. H., Alpert N. R., Periasamy M. Effect of thyroid hormone on the expression of mRNA encoding sarcoplasmic reticulum proteins // Circ. Res. - 1991. - V. 69. - № 2. - P. 266–276.
 20. Arrojo E Drigo R., Fonseca T. L., Werneck-De-Castro J. P. S., Bianco A. C. Role of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in the control of thyroid hormone signaling // Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. - 2013. - V. 1830. - № 7. - P. 3956–3964.
 21. Asahi T., Shimabukuro M., Oshiro Y., Yoshida H., Takasu N. Cilazapril prevents cardiac hypertrophy and postischemic myocardial dysfunction in hyperthyroid rats // Thyroid. - 2001. - V. 11. - № 11. - P. 1009–1015.
 22. Awad H. A., Alrefaie Z. A. An evidence for the transcriptional regulation of iodothyronine

- deiodinase 2 by progesterone in ovariectomized rats // *J. Physiol. Biochem.* - 2014. - V. 70. - № 2. - P. 331–339.
23. Axelband F., Dias J., Ferra F. M. Nongenomic signaling pathways triggered by thyroid hormones and their metabolite 3-iodothyronamine on the cardiovascular system // *J. Cell. Physiol.* - 2010. - V. 226. - № July. - P. 21–28.
 24. Axelsson S., Björklund A., Lindvall O. Fluorescence histochemistry of biogenic monoamines. A study of the capacity of various carbonyl compounds to form fluorophores with biogenic monoamines in gas phase reactions. // *J. Histochem. Cytochem.* - 1972. - V. 20. - № 6. - P. 435–444.
 25. Balzan S., Carratore R. Del, Nardulli C., Sabatino L., Lubrano V., Iervasi G. The stimulative effect of T3 and T4 on human myocardial endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis // *Clin. Exp. Cardiol.* - 2013. - V. 4. - № 12. - P. 1–7.
 26. Baqui M. M. A., Gereben B., Harney J. W., Larsen P. R., Bianco A. C. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy // *Endocrinology.* - 2000. - V. 141. - № 11. - P. 4309–4312.
 27. Barca-Mayo O., Liao X. H., Alonso M., Cosmo C. di, Hernandez A., Refetoff S., Weiss R. E. Thyroid hormone receptor α and regulation of type 3 deiodinase // *Mol. Endocrinol.* - 2011. - V. 25. - № 4. - P. 575–583.
 28. Barnhart J. L., Witt B. L., Hardison W. G., Berk R. N. Uptake of iopanoic acid by isolated rat hepatocytes in primary culture // *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* - 1983. - V. 7. - № 6. - P. G630-6.
 29. Barreto-Chaves M. L., Souza Monteiro P. De, Fürstenau C. R. Acute actions of thyroid hormone on blood vessel biochemistry and physiology // *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* - 2011. - V. 18. - № 5. - P. 300–303.
 30. Bartha T., Kim S. W., Salvatore D., Gereben B., Tu H. M., Harney J. W., Rudas P., Reed Larsen P. Characterization of the 5'-flanking and 5'-untranslated regions of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive human type 2 iodothyronine deiodinase gene // *Endocrinology.* - 2000. - V. 141. - № 1. - P. 229–237.
 31. Bates J. M., Germain D. L. St., Galton V. A. Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat // *Endocrinology.* - 1999. - V. 140. - № 2. - P. 844–851.
 32. Baumgartner-Parzer S. M., Wagner L., Reining G., Sexl V., Nowotny P., Müller M., Brunner M., Waldhäusl W. Increase by tri-iodothyronine of endothelin-1, fibronectin and von Willebrand factor in cultured endothelial cells // *J. Endocrinol.* - 1997. - V. 154. - № 2. - P. 231–239.

33. Bausch L., McAllister R. M. Effects of hypothyroidism on the skeletal muscle blood flow response to contractions. // *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* - 2003. - V. 50. - № 3. - P. 117–22.
34. Belmadani S., Zerfaoui M., Boulares H. A., Palen D. I., Matrougui K. Microvessel vascular smooth muscle cells contribute to collagen type I deposition through ERK1/2 MAP kinase, $\alpha\beta 3$ -integrin, and TGF- $\beta 1$ in response to ANG II and high glucose // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* - 2008. - V. 295. - № 1. - P. H69-76.
35. Bergdahl A., Gomez M. F., Wihlborg A. K., Erlinge D., Eyjolfson A., Xu S. Z., Beech D. J., Dreja K., Hellstrand P. Plasticity of TRPC expression in arterial smooth muscle: Correlation with store-operated Ca^{2+} entry // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* - 2005. - V. 288. - № 4. - P. C872-80.
36. Bergh J. J., Lin H.-Y., Lansing L., Mohamed S. N., Davis F. B., Mousa S., Davis P. J. Integrin $\alpha V\beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. // *Endocrinology.* - 2005. - V. 146. - № 7. - P. 2864–71.
37. Bernal J. Thyroid hormone regulated genes in cerebral cortex development // *J. Endocrinol.* - 2017. - V. 232. - № 2. - P. R83–R97.
38. Berta E., Lengyel I., Halmi S., Zrínyi M., Erdei A., Harangi M., Páll D., Nagy E. V., Bodor M. Hypertension in thyroid disorders // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* - 2019. - V. 10. - № JULY. - P. 482.
39. Bianco A. C., Sheng X., Silva J. E. Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis // *J. Biol. Chem.* - 1988. - V. 263. - № 34. - P. 18168–18175.
40. Bianco A. C., Salvatore D., Gereben B., Berry M. J., Larsen P. R. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases // *Endocr. Rev.* - 2002. - V. 23. - № 1. - P. 38–89.
41. Bianco A. C. et al. American thyroid association guide to investigating thyroid hormone economy and action in rodent and cell models // *Thyroid.* - 2014. - V. 24. - № 1. - P. 88–168.
42. Bianco A. C., Dumitrescu A., Gereben B., Ribeiro M. O., Fonseca T. L., Fernandes G. W., Bocco B. M. L. C. Paradigms of dynamic control of thyroid hormone signaling. // *Endocr. Rev.* - 2019. - V. 40. - № 4. - P. 1000–1047.
43. Bianco A. C., Conceição R. R. da. The deiodinase trio and thyroid hormone signaling methods in molecular biology. / ed. M. Plateroti, J. Samarut. New York, NY: Springer New York, 2018. P. 67–83.
44. Bianco A. C., Kim B. W. Deiodinases: Implications of the local control of thyroid hormone

- action // *J. Clin. Invest.* - 2006. - V. 116. - № 10. - P. 2571–2579.
45. Bianco A. C., Silva J. E. Nuclear 3,5,3-triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue: Receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques // *Endocrinology.* - 1987a. - V. 120. - № 1. - P. 55–62.
 46. Bianco A. C., Silva J. E. Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. // *J. Clin. Invest.* - 1987b. - V. 79. - № 1. - P. 295–300.
 47. Bianco A. C., Silva J. E. Cold exposure rapidly induces virtual saturation of brown adipose tissue nuclear T3 receptors // *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* - 1988. - V. 255. - № 4. - P. 496–503.
 48. Björklund A., Lindvall O., Svensson L. Å. Mechanisms of fluorophore formation in the histochemical glyoxylic acid method for monoamines // *Histochemie.* - 1972. - V. 32. - № 2. - P. 113–131.
 49. Bocco B. M. L. C., Louzada R. A. N., Silvestre D. H. S., Santos M. C. S., Anne-Palmer E., Rangel I. F., Abdalla S., Ferreira A. C., Ribeiro M. O., Gereben B., Carvalho D. P., Bianco A. C., Werneck-de-Castro J. P. Thyroid hormone activation by type 2 deiodinase mediates exercise-induced peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α expression in skeletal muscle // *J. Physiol.* - 2016. - V. 594. - № 18. - P. 5255–5269.
 50. Bolz S. S., Pieperhoff S., Wit C. De, Pohl U. Intact endothelial and smooth muscle function in small resistance arteries after 48 h in vessel culture // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* - 2000. - V. 279. - № 3 - P. H1434-9.
 51. Botta J., Mendoza D. De, Morero R. D., Farias R. N. High affinity L-triiodothyronine binding sites on washed rat erythrocyte membranes // *J. Biol. Chem.* - 1983. - V. 258. - № 11. - P. 6690–6692.
 52. Bradley D. J., Towle H. C., Young W. S. Spatial and temporal expression of α - and β -thyroid hormone receptor mRNAs, including the β 2-subtype, in the developing mammalian nervous system // *J. Neurosci.* - 1992. - V. 12. - № 6. - P. 2288–2302.
 53. Burggraaf J., Tulen J. H., Lalezari S., Schoemaker R. C., Meyer P. H. De, Meinders A. E., Cohen A. F., Pijl H. Sympathovagal imbalance in hyperthyroidism. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* - 2001. - V. 281. - № 1. - P. E190--5.
 54. Burmeister L. A., Pachucki J., Germain D. L. St. Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and posttranslational mechanisms // *Endocrinology.* - 1997. - V. 138. - № 12. - P. 5231–5237.
 55. Bussemaker E., Popp R., Fisslthaler B., Larson C. M., Fleming I., Busse R., Brandes R. P. Hyperthyroidism enhances endothelium-dependent relaxation in the rat renal artery //

- Cardiovasc. Res. - 2003. - № 59. - P. 181–188.
56. Buus N. H., VanBavel E., Mulvany M. J. Differences in sensitivity of rat mesenteric small arteries to agonists when studied as ring preparations or as cannulated preparations // *Br. J. Pharmacol.* - 1994. - V. 112. - № 2. - P. 579–587.
 57. Cai Y., Manio M. M., Leung G. P. H., Xu A., Tang E. H. C., Vanhoutte P. M. Thyroid hormone affects both endothelial and vascular smooth muscle cells in rat arteries // *Eur. J. Pharmacol.* - 2015. - V. 747. - P. 18–28.
 58. Calvo R. M., Obregon M.-J. Presence and regulation of D1 and D2 deiodinases in rat white adipose tissue. // *Metabolism.* - 2011. - V. 60. - № 9. - P. 1207–10.
 59. Campanha F. V. G., Perone D., Campos D. H. S. de, Luvizotto R. A. M. de, SÍbio M. T. de, Oliveira M. de, Olimpio R. M. C., Moretto F. C. F., Padovani C. R., Mazeto G. M. F. S., Cicogna A. C., Nogueira C. R. Thyroxine increases Serca2 and Ryr2 gene expression in heart failure rats with euthyroid sick syndrome // *Arch. Endocrinol. Metab.* - 2016. - V. 60. - № 6. - P. 582–586.
 60. Cao X., Kambe F., Moeller L. C., Refetoff S., Seo H. Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts // *Mol. Endocrinol.* - 2005. - V. 19. - № 1. - P. 102–112.
 61. Cao X., Kambe F., Yamauchi M., Seo H. Thyroid-hormone-dependent activation of the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade requires Src and enhances neuronal survival. // *Biochem. J.* - 2009. - V. 424. - № 2. - P. 201–9.
 62. Cao Y. X., Xu C. B., Luo G. G., Edvinsson L. Up-regulation of α 1A-adrenoceptors in rat mesenteric artery involves intracellular signal pathways // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* - 2006. - V. 98. - № 1. - P. 61–67.
 63. Carrillo-Sepulveda M. A., Ceravolo G. S., Fortes Z. B., Carvalho M. H., Tostes R. C., Laurindo F. R., Webb R. C., Barreto-Chaves M. L. M. Thyroid hormone stimulates NO production via activation of the PI3K/Akt pathway in vascular myocytes // *Cardiovasc. Res.* - 2010. - V. 85. - № 3. - P. 560–570.
 64. Castro A. L. de, Tavares A. V., Fernandes R. O., Campos C., Conzatti A., Siqueira R., Fernandes T. R. G., Schenkel P. C., Sartório C. L., Llesuy S., Belló-Klein A., Rosa Araujo A. S. da. T3 and T4 decrease ROS levels and increase endothelial nitric oxide synthase expression in the myocardium of infarcted rats // *Mol. Cell. Biochem.* - 2015. - V. 408. - № 1–2. - P. 235–243.
 65. Chassande O., Fraichard A., Gauthier K., Flamant F., Legrand C., Savatier P., Laudet V., Samarut J. Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA α locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor- α and triiodothyronine receptor activities // *Mol.*

- Endocrinol. - 1997. - V. 11. - № 9. - P. 1278–1290.
66. Chataigneau T., Félétou M., Huang P. L., Fishman M. C., Duhault J., Vanhoutte P. M. Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice // *Br. J. Pharmacol.* - 1999. - V. 126. - № 1. - P. 219–226.
 67. Chattergoon N. N., Giraud G. D., Louey S., Stork P., Fowden A. L., Thornburg K. L. Thyroid hormone drives fetal cardiomyocyte maturation // *FASEB J.* - 2012. - V. 26. - № 1. - P. 397–408.
 68. Chen J.-L., Chiu H.-W., Tseng Y.-J., Chu W.-C. Hyperthyroidism is characterized by both increased sympathetic and decreased vagal modulation of heart rate: evidence from spectral analysis of heart rate variability. // *Clin. Endocrinol. (Oxf).* - 2006. - V. 64. - № 6. - P. 611–616.
 69. Chen Y., Lee H., Tong H., Schwartz M., Zhu C. Force regulated conformational change of integrin $\alpha V\beta 3$ // *Matrix Biol.* - 2017. - V. 60–61. - P. 70–85.
 70. Cheng S. Y. Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. // *Rev. Endocr. Metab. Disord.* - 2000. - V. 1. - № 1–2. - P. 9–18.
 71. Cheng S. Y., Leonard J. L., Davis P. J. Molecular aspects of thyroid hormone actions // *Endocr. Rev.* - 2010. - V. 31. - № 2. - P. 139–170.
 72. Christensen S. T., Haanes K. A., Spray S., Grell A. S., Warfvinge K., Edvinsson L., Johansson S. E. Pre-clinical effects of highly potent MEK1/2 inhibitors on rat cerebral vasculature after organ culture and subarachnoid haemorrhage // *Clin. Sci.* - 2019. - V. 133. - № 16. - P. 1797–1811.
 73. Christoffolete M. A., Ribeiro R., Singru P., Fekete C., Silva W. S. Da, Gordon D. F., Huang S. A., Crescenzi A., Harney J. W., Ridgway E. C., Larsen P. R., Lechan R. M., Bianco A. C. Atypical expression of type 2 iodothyronine deiodinase in thyrotrophs explains the thyroxine-mediated pituitary thyrotropin feedback mechanism // *Endocrinology.* - 2006. - V. 147. - № 4. - P. 1735–1743.
 74. Cody V., Davis P. J., Davis F. B. Molecular modeling of the thyroid hormone interactions with $\alpha v\beta 3$ integrin // *Steroids.* - 2007. - V. 72. - № 2. - P. 165–170.
 75. Colantuoni A., Marchiafava P. L., Lapi D., Forini F. S., Iervasi G. Effects of tetraiodothyronine and triiodothyronine on hamster cheek pouch microcirculation // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* - 2005. - V. 288. - № 4. - P. H1931–H1936.
 76. Coppola A., Hughes J., Esposito E., Schiavo L., Meli R., Diano S. Suppression of hypothalamic deiodinase type II activity blunts TRH mRNA decline during fasting // *FEBS Lett.* - 2005. - V. 579. - № 21. - P. 4654–4658.
 77. Croteau W., Davey J. C., Galton V. A., Germain D. L. St. Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues // *J. Clin. Invest.* - 1996. - V. 98. - № 2. - P. 405–417.
 78. D'Angelo G., Adam L. P. Inhibition of ERK attenuates force development by lowering myosin

- light chain phosphorylation // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* - 2002. - V. 282. - № 2 - P. H602-10.
79. Daeichin V., Kooiman K., Skachkov I., Bosch J. G., Theelen T. L., Steiger K., Needles A., Janssen B. J., Daemen M. J. A. P., Steen A. F. W. van der, Jong N. de, Sluimer J. C. Quantification of endothelial $\alpha v \beta 3$ expression with high-frequency ultrasound and targeted microbubbles: in vitro and in vivo studies // *Ultrasound Med. Biol.* - 2016. - V. 42. - № 9. - P. 2283–2293.
80. Danzi S., Klein I. Thyroid disease and the cardiovascular system // *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* - 2014. - V. 43. - № 2. - P. 517–528.
81. Das B., Matsuda H., Fujimoto K., Sun G., Matsuura K., Shi Y.-B. Molecular and genetic studies suggest that thyroid hormone receptor is both necessary and sufficient to mediate the developmental effects of thyroid hormone. // *Gen. Comp. Endocrinol.* - 2010. - V. 168. - № 2. - P. 174–80.
82. Davis M. J., Wu X., Nurkiewicz T. R., Kawasaki J., Gui P., Hill M. A., Wilson E. Regulation of ion channels by integrins // *Cell Biochem. Biophys.* - 2002. - V. 36. - № 1. - P. 41–66.
83. Davis P. J., Shih A., Lin H. Y., Martino L. J., Davis F. B. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR // *J. Biol. Chem.* - 2000. - V. 275. - № 48. - P. 38032–38039.
84. Davis P. J., Davis F. B., Lin H.-Y., Mousa S. a, Zhou M., Luidens M. K. Translational implications of nongenomic actions of thyroid hormone initiated at its integrin receptor // *Am. J. Physiol. Metab.* - 2009. - V. 297. - № 6. - P. E1238–E1246.
85. Davis P. J., Leonard J. L., Lin H.-Y., Leinung M., Mousa S. A. Molecular basis of nongenomic actions of thyroid hormone. // *Vitamins and hormones.* : Elsevier Inc., 2018. 1st edition. P. 67–96.
86. Davis P. J., Leonard J. L., Davis F. B. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. // *Front. Neuroendocrinol.* - 2008. - V. 29. - № 2. - P. 211–8.
87. Delp M. D., McAllister R. M., Laughlin M. H. Exercise training alters aortic vascular reactivity in hypothyroid rats // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* - 1995. - V. 268. - № 4pt2. – P. H1428-35 37-4.
88. Deng J., Zhao R., Zhang Z., Wang J. Changes in vasoreactivity of rat large- and medium-sized arteries induced by hyperthyroidism // *Exp. Toxicol. Pathol.* - 2010. - V. 62. - № 3. - P. 317–322.
89. Deng J. T., Lierop J. E. Van, Sutherland C., Walsh M. P. Ca²⁺-independent Smooth Muscle Contraction // *J. Biol. Chem.* - 2001. - V. 276. - № 19. - P. 16365–16373.
90. Deng J. T., Sutherland C., Brautigam D. L., Eto M., Walsh M. P. Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase. // *Biochem. J.* - 2002. - V.

367. - № Pt 2. - P. 517–24.
91. Diallo E. M., Wilhelm K. G., Thompson D. L., Koenig R. J. Variable RXR requirements for thyroid hormone responsiveness of endogenous genes // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2007. - V. 264. - № 1–2. - P. 149–156.
 92. Diekman M. J., Zandieh Doulabi B., Platvoet-Ter Schiphorst M., Fliers E., Bakker O., Wiersinga W. M. The biological relevance of thyroid hormone receptors in immortalized human umbilical vein endothelial cells. // *J. Endocrinol.* - 2001. - V. 168. - № 3. - P. 427–33.
 93. Dietrich J. B., Kuchler-Bopp S., Boutillier S., Ittel M. E., Reeber A., Zaepfel M., Delaunoy J. P., Vincendon G. Expression of thyroid hormone receptors alpha and beta-1 messenger RNAs in human endothelial cells. The T3 hormone stimulates the synthesis of the messenger RNA of the intercellular adhesion molecule-1. // *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* - 1997. - V. 43. - № 8. - P. 1205–12.
 94. Donzelli R., Colligiani D., Kusmic C., Sabatini M., Lorenzini L., Accorroni A., Nannipieri M., Saba A., Iervasi G., Zucchi R. Effect of hypothyroidism and hyperthyroidism on tissue thyroid hormone concentrations in rat. // *Eur. Thyroid J.* - 2016. - V. 5. - № 1. - P. 27–34.
 95. Dora J. M., Machado W. E., Rheinheimer J., Crispim D., Maia A. L. Association of the type 2 deiodinase Thr92Ala polymorphism with type 2 diabetes: Case-control study and meta-analysis // *Eur. J. Endocrinol.* - 2010. - V. 163. - № 3. - P. 427–434.
 96. Dunn W. R., Wellman G. C., Bevan J. A. Enhanced resistance artery sensitivity to agonists under isobaric compared with isometric conditions // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* - 1994. - V. 266. - № 1 - P. H147-55
 97. Dwivedi A., Sala-Newby G. B., George S. J. Regulation of cell–matrix contacts and β -catenin signaling in VSMC by integrin-linked kinase: implications for intimal thickening // *Basic Res. Cardiol.* - 2008. - V. 103. - № 3. - P. 244–256.
 98. Fan G., Cui Y., Gollasch M., Kassmann M. Elementary calcium signaling in arterial smooth muscle // *Channels.* - 2019. - V. 13. - № 1. - P. 505–519.
 99. Fernández V., Tapia G., Varela P., Cornejo P., Videla L. A. Upregulation of liver inducible nitric oxide synthase following thyroid hormone preconditioning: Suppression by N-acetylcysteine // *Biol. Res.* - 2009. - V. 42. - № 4. - P. 487–495.
 100. Flamant F., Cheng S. Y., Hollenberg A. N., Moeller L. C., Samarut J., Wondisford F. E., Yen P. M., Refetoff S. Thyroid hormone signaling pathways: Time for a more precise nomenclature // *Endocrinology.* - 2017. - V. 158. - № 7. - P. 2052–2057.
 101. Flamant F., Samarut J. Thyroid hormone receptors: Lessons from knockout and knock-in mutant mice // *Trends Endocrinol. Metab.* - 2003. - V. 14. - № 2. - P. 85–90.
 102. Flamini M. I., Uzair I. D., Pennacchio G. E., Neira F. J., Mondaca J. M., Cuello-Carrión F. D.,

- Jahn G. A., Simoncini T., Sanchez A. M. Thyroid hormone controls breast cancer cell movement via integrin $\alpha V/\beta 3$ /SRC/FAK/PI3-kinases // *Horm. Cancer*. - 2017. - V. 8. - № 1. - P. 16–27.
103. Freindorf M., Furlani T. R., Kong J., Cody V., Davis F. B., Davis P. J. Combined QM/MM study of thyroid and steroid hormone analogue interactions with integrin // *J. Biomed. Biotechnol.* - 2012. - V. 2012. - P. 1–12.
104. Frey H. M. Studies on peripheral circulatory and metabolic consequences of thyrotoxicosis. // *J. Oslo City Hosp.* - 1967. - V. 17. - № 1. - P. 3–26.
105. Friedrich E. B., Clever Y. P., Wassmann S., Werner N., Böhm M., Nickenig G. Role of integrin-linked kinase in vascular smooth muscle cells: Regulation by statins and angiotensin II // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2006. - V. 349. - № 3. - P. 883–889.
106. Gachkar S., Nock S., Geissler C., Oelkrug R., Johann K., Resch J., Rahman A., Arner A., Kirchner H., Mittag J. Aortic effects of thyroid hormone in male mice // *J. Mol. Endocrinol.* - 2019. - V. 62. - № 3. - P. 91–99.
107. Galton V. A. The ups and downs of the thyroxine pro-hormone hypothesis // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2017. - V. 458. - P. 105–111.
108. Galton V. A., Wood E. T., Germain E. A. St., Withrow C. A., Aldrich G., Germain G. M. St., Clark A. S., Germain D. L. St. Thyroid hormone homeostasis and action in the type 2 deiodinase-deficient rodent brain during development // *Endocrinology*. - 2007. - V. 148. - № 7. - P. 3080–3088.
109. Galton V. A., Waard E. De, Parlow A. F., St Germain D. L., Hernandez A. Life without the iodothyronine deiodinases // *Endocrinology*. - 2014. - V. 155. - № 10. - P. 4081–4087.
110. Garmendia Madariaga A., Santos Palacios S., Guillén-Grima F., Galofré J. C. The incidence and prevalence of thyroid dysfunction in Europe: a meta-analysis // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2014. - V. 99. - № 3. - P. 923–31.
111. Gaynullina D., Lubomirov L. T., Sofronova S. I., Kalenchuk V. U., Gloe T., Pfitzer G., Tarasova O. S., Schubert R. Functional remodelling of arterial endothelium during early postnatal development in rats // *Cardiovasc. Res.* - 2013. - V. 99. - № 4. - P. 612–621.
112. Gaynullina D. K., Sofronova S. I., Selivanova E. K., Shvetsova A. A., Borzykh A. A., Sharova A. P., Kostyunina D. S., Martyanov A. A., Tarasova O. S. NO-mediated anticontractile effect of the endothelium is abolished in coronary arteries of adult rats with antenatal/early postnatal hypothyroidism // *Nitric Oxide*. - 2017. - V. 63. - P. 21–28.
113. Gaynullina D. K., Sofronova S. I., Shvetsova A. A., Selivanova E. K., Sharova A. P., Martyanov A. A., Tarasova O. S. Antenatal/early postnatal hypothyroidism increases the contribution of Rho-kinase to contractile responses of mesenteric and skeletal muscle arteries in adult rats // *Pediatr. Res.* - 2018. - V. 84. - № 1. - P. 112–117.

114. Gaynullina D. K., Kudryashova T. V, Vorotnikov A. V, Schubert R., Tarasova O. S. MAPKs are highly abundant but do not contribute to α 1-adrenergic contraction of rat saphenous arteries in the early postnatal period // *Int. J. Mol. Sci.* - 2021. - V. 22. - № 11. - P. 6037.
115. Geist D., Hönes G. S., Gassen J., Kerp H., Kleinbongard P., Heusch G., Führer D., Moeller L. C. Noncanonical thyroid hormone receptor α action mediates arterial vasodilation. // *Endocrinology.* - 2021. - V. 162. - № 7. - P. 1–10.
116. Gereben B., Goncalves C., Harney J. W., Larsen P. R., Bianco A. C. Selective proteolysis of human type 2 deiodinase: A novel ubiquitin-proteasomal mediated mechanism for regulation of hormone activation // *Mol. Endocrinol.* - 2000. - V. 14. - № 11. - P. 1697–1708.
117. Gereben B., Zavacki A. M., Ribich S., Kim B. W., Huang S. a., Simonides W. S., Zeöld A., Bianco A. C. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling // *Endocr. Rev.* - 2008. - V. 29. - № 7. - P. 898–938.
118. Gereben B., Salvatore D. Pretranslational regulation of type 2 deiodinase // *Thyroid.* - 2005. - V. 15. - № 8. - P. 855–864.
119. Germain D. L. St. The effects and interactions of substrates, inhibitors, and the cellular thiol-disulfide balance on the regulation of type II iodothyronine 5'-deiodinase // *Endocrinology.* - 1988. - V. 122. - № 5. - P. 1860–1868.
120. Giammanco M., Liegro C. M. Di, Schiera G., Liegro I. Di. Genomic and non-genomic mechanisms of action of thyroid hormones and their catabolite 3,5-diiodo-l-thyronine in Mammals // *Int. J. Mol. Sci.* - 2020. - V. 21. - № 11. - P. 1–40.
121. Giustarini D., Rossi R., Milzani A., Dalle-Donne I. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. // *Methods Enzymol.* - 2008. - V. 440. - P. 361–80.
122. Gosteli-Peter M. A., Harder B. A., Eppenberger H. M., Zapf J., Schaub M. C. Triiodothyronine induces over-expression of α -smooth muscle actin, restricts myofibrillar expansion and is permissive for the action of basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor I in adult rat cardiomyocytes // *J. Clin. Invest.* - 1996. - V. 98. - № 8. - P. 1737–1744.
123. Grassie M. E., Moffat L. D., Walsh M. P., MacDonald J. A. The myosin phosphatase targeting protein (MYPT) family: a regulated mechanism for achieving substrate specificity of the catalytic subunit of protein phosphatase type 1 δ . // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2011. - V. 510. - № 2. - P. 147–59.
124. Grieve D. J., Fletcher S., Pitsillides A. A., Botham K. M., Elliott J. Effects of oral propylthiouracil treatment on nitric oxide production in rat aorta // *Br. J. Pharmacol.* - 1999. - V. 127. - № 1. - P. 1–8.
125. Gui P., Chao J. T., Wu X., Yang Y., Davis G. E., Davis M. J. Coordinated regulation of vascular

- Ca²⁺ and K⁺ channels by integrin signaling // *Adv. Exp. Med. Biol.* - 2010. - V. 674. - P. 69–79.
126. Gullberg H., Rudling M., Saltó C., Forrest D., Angelin B., Vennström B. Requirement for thyroid hormone receptor β in T3 regulation of cholesterol metabolism in mice // *Mol. Endocrinol.* - 2002. - V. 16. - № 8. - P. 1767–1777.
127. Gumieniak O., Perlstein T. S., Williams J. S., Hopkins P. N., Brown N. J., Raby B. A., Williams G. H. Ala92 type 2 deiodinase allele increases risk for the development of hypertension // *Hypertension.* - 2007. - V. 49. - № 3. - P. 461–466.
128. Harnett K. M., Cao W., Biancani P. Signal-transduction pathways that regulate smooth muscle function. I. Signal transduction in phasic (esophageal) and tonic (gastroesophageal sphincter) smooth muscles // *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* - 2005. - V. 288. - № 3. - P. G407-16.
129. Hartong R., Wang N., Kurokawa R., Lazar M. A., Glass C. K., Apriletti J. W., Dillmann W. H. Delineation of three different thyroid hormone-response elements in promoter of rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase gene. Demonstration that retinoid X receptor binds 5' to thyroid hormone receptor in response element 1 // *J. Biol. Chem.* - 1994. - V. 269. - № 17. - P. 13021–13029.
130. Herder W. W. de, Hazenberg M. P., Pennock-Schröder A. M., Oosterlaken A. C., Rutgers M., Visser T. J. On the enterohepatic cycle of triiodothyronine in rats; importance of the intestinal microflora // *Life Sci.* - 1989. - V. 45. - № 9. - P. 849–856.
131. Hill M. A., Meininger G. A. Arteriolar vascular smooth muscle cells: Mechanotransducers in a complex environment // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* - 2012. - V. 44. - № 9. - P. 1505–1510.
132. Hiroi Y., Kim H., Ying H., Furuya F., Huang Z., Simoncini T., Noma K., Ueki K., Nguyen N., Scanlan T. S., Moskowitz M. A., Cheng S., Liao J. K. Rapid nongenomic actions of thyroid hormone // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2006. - V. 103. - № 38. - P. 14104–14109.
133. Hodin R. A., Lazar M. A., Chin W. W. Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone // *J. Clin. Invest.* - 1990. - V. 85. - № 1. - P. 101–105.
134. Hollenberg A. N., Monden T., Flynn T. R., Boers M. E., Cohen O., Wondisford F. E. The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements // *Mol. Endocrinol.* - 1995. - V. 9. - № 5. - P. 540–550.
135. Honda H., Iwata T., Mochizuki T., Kogo H. Changes in vascular reactivity induced by acute hyperthyroidism in isolated rat aortae // *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* - 2000. - V. 34. - № 6. - P. 429–434.
136. Hosoi Y., Murakami M., Mizuma H., Ogiwara T., Imamura M., Mori M. Expression and

- regulation of type II iodothyronine deiodinase in cultured human skeletal muscle cells. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 1999. - V. 84. - № 9. - P. 3293–300.
137. Hu L., Wu C. Using single-cell RNA-seq data to trace tissue cells responsive to thyroid hormones // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. - 2021. - V. 12. - P. 609308.
138. Huang S. A., Dorfman D. M., Genest D. R., Salvatore D., Larsen P. R. Type 3 iodothyronine deiodinase is highly expressed in the human uteroplacental unit and in fetal epithelium // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2003. - V. 88. - № 3. - P. 1384–1388.
139. Hudecova S., Vadaszova A., Soukup T., Krizanova O. Effect of thyroid hormones on the gene expression of calcium transport systems in rat muscles // *Life Sci.* - 2004. - V. 75. - № 8. - P. 923–931.
140. Hynes R. O. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion // *Cell.* - 1992. - V. 69. - № 1. - P. 11–25.
141. Ihara E., Moffat L., Ostrander J., Walsh M. P., MacDonald J. A. Characterization of protein kinase pathways responsible for Ca²⁺ sensitization in rat ileal longitudinal smooth muscle // *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* - 2007. - V. 293. - № 4. - P. G699–G710.
142. Ishizuka T., Lazar M. A. The nuclear receptor corepressor deacetylase activating domain is essential for repression by thyroid hormone receptor // *Mol. Endocrinol.* - 2005. - V. 19. - № 6. - P. 1443–1451.
143. Iwata T., Honda H. Acute hyperthyroidism alters adrenoceptor- and muscarinic receptor-mediated responses in isolated rat renal and femoral arteries // *Eur. J. Pharmacol.* - 2004. - V. 493. - № 1–3. - P. 191–199.
144. Jabbar A., Pingitore A., Pearce S. H. S., Zaman A., Iervasi G., Razvi S. Thyroid hormones and cardiovascular disease // *Nat. Rev. Cardiol.* - 2016. - V. 14. - № 1. - P. 39–55.
145. James Cao H., Lin H.-Y., Luidens M. K., Davis F. B., Davis P. J. Cytoplasm-to-nucleus shuttling of thyroid hormone receptor- β 1 (Tr β 1) is directed from a plasma membrane integrin receptor by thyroid hormone // *Endocr. Res.* - 2009. - V. 34. - № 1–2. - P. 31–42.
146. Janssen S. T., Janssen O. E. Directional thyroid hormone distribution via the blood stream to target sites // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2017. - V. 458. - P. 16–21.
147. Jean Sprinkle D., Subbiah M. T. R. Studies on aorta during development I. Fetal rabbit aorta under ex vivo and in vitro conditions: rapid changes in smooth muscle cell phenotype, cell proliferation and cholesterol content with organ culture // *Atherosclerosis.* - 1987. - V. 67. - № 1. - P. 57–69.
148. Jenkins W. S. et al. In vivo α -V β -3 integrin expression in human aortic atherosclerosis // *Heart.* - 2019. - V. 105. - № 24. - P. 1868–1875.
149. Jones I., Ng L., Liu H., Forrest D. An intron control region differentially regulates expression of

- thyroid hormone receptor $\beta 2$ in the cochlea, pituitary, and cone photoreceptors // *Mol. Endocrinol.* - 2007. - V. 21. - № 5. - P. 1108–1119.
150. Jones R., Henschen L., Mohell N., Nedergaard J. Requirement of gene transcription and protein synthesis for cold-and norepinephrine-induced stimulation of thyroxine deiodinase in rat brown adipose tissue // *BBA - Mol. Cell Res.* - 1986. - V. 889. - № 3. - P. 366–373.
151. Kalyanaraman H., Schwappacher R., Joshua J., Zhuang S., Scott B. T., Klos M., Casteel D. E., Frangos J. A., Dillmann W., Boss G. R., Pilz R. B. Nongenomic thyroid hormone signaling occurs through a plasma membrane-localized receptor // *Sci. Signal.* - 2014. - V. 7. - № 326. - P. ra48.
152. Kamitani T., Ikeda U., Muto S., Kawakami K., Nagano K., Tsuruya Y., Oguchi A., Yamamoto K., Hara Y., Kojima T., Medford R. M., Shimada K. Regulation of Na,K-ATPase gene expression by thyroid hormone in rat cardiocytes // *Circ. Res.* - 1992. - V. 71. - № 6. - P. 1457–1464.
153. Kaplan M. M., Yaskoski K. A. Phenolic and tyrosyl ring deiodination of iodothyronines in rat brain homogenates. // *J. Clin. Invest.* - 1980. - V. 66. - № 3. - P. 551–562.
154. Kasahara T., Tsunekawa K., Seki K., Mori M., Murakami M. Regulation of iodothyronine deiodinase and roles of thyroid hormones in human coronary artery smooth muscle cells // *Atherosclerosis.* - 2006. - V. 186. - № 1. - P. 207–214.
155. Katzeff H. L., Powell S. R., Ojamaa K. Alterations in cardiac contractility and gene expression during low-T3 syndrome: prevention with T3. // *Am. J. Physiol.* - 1997. - V. 273. - № 5 Pt 1. - P. E951-6.
156. Khaddaj Mallat R., Mathew John C., Kendrick D. J., Braun A. P. The vascular endothelium: A regulator of arterial tone and interface for the immune system // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* - 2017. - V. 54. - № 7–8. - P. 458–470.
157. Kim S. W., Harney J. W., Larsen P. R. Studies of the hormonal regulation of type 2 5'-iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in pituitary tumor cells using semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction // *Endocrinology.* - 1998. - V. 139. - № 12. - P. 4895–4905.
158. Kimura K., Shinozaki Y., Jujo S., Shizuma T., Fukuyama N., Nakazawa H. Triiodothyronine acutely increases blood flow in the ventricles and kidneys of anesthetized rabbits // *Thyroid.* - 2006. - V. 16. - № 4. - P. 357–360.
159. Kitazawa T., Eto M., Woodsome T. P., Khalequzzaman M. Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca^{2+} sensitization in rabbit smooth muscle // *J. Physiol.* - 2003. - V. 546. - № 3. - P. 879–889.
160. Klein I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. // *Am. J. Med.* - 1990. - V. 88. - № 6. -

- P. 631–7.
161. Knock G. A., Shaifta Y., Snetkov V. A., Vowles B., Drndarski S., Ward J. P. T., Aaronson P. I. Interaction between src family kinases and rho-kinase in agonist-induced Ca²⁺-sensitization of rat pulmonary artery // *Cardiovasc. Res.* - 2008. - V. 77. - № 3. - P. 570–579.
 162. Kohrle J., Rasmussen U. B., Ekenbarger D. M., Alex S., Rokos H., Hesch R. D., Leonard J. L. Affinity labeling of rat liver and kidney type I 5'-deiodinase. Identification of the 27-kDa substrate binding subunit // *J. Biol. Chem.* - 1990. - V. 265. - № 11. - P. 6155–6163.
 163. Kostyunina D. S., Zhang L., Shvetsova A. A., Selivanova E. K., Tarasova O. S., Matchkov V. V., Gaynullina D. K. Trophic sympathetic influence weakens pro-contractile role of Cl⁻ channels in rat arteries during postnatal maturation. // *Sci. Rep.* - 2020. - V. 10. - № 1. - P. 20002.
 164. Krasner J. L., Wendling W. W., Cooper S. C., Chen D., Hellmann S. K., Eldridge C. J., McClurken J. B., Jeevanandam V., Carlsson C. Direct effects of triiodothyronine on human internal mammary artery and saphenous veins // *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* - 1997. - V. 11. - № 4. - P. 463–466.
 165. Kyriacou A., Kyriacou A., Makris K. C., Syed A. A., Perros P. Weight gain following treatment of hyperthyroidism—A forgotten tale // *Clin. Obes.* - 2019. - V. 9. - № 5. - P. e12328.
 166. Lafoya B., Munroe J. A., Miyamoto A., Detweiler M. A., Crow J. J., Gazdik T., Albig A. R. Beyond the matrix: The many non-ECM ligands for integrins // *Int. J. Mol. Sci.* - 2018. - V. 19. - № 2. - P. 449.
 167. Larsen P. R., Silva J. E., Kaplan M. M. Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: Physiological and clinical implications // *Endocr. Rev.* - 1981. - V. 2. - № 1. - P. 87–102.
 168. Laurberg P. Mechanisms governing the relative proportions of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in thyroid secretion // *Metabolism.* - 1984. - V. 33. - № 4. - P. 379–392.
 169. Lee J.-Y., Takahashi N., Yasubuchi M., Kim Y.-I., Hashizaki H., Kim M.-J., Sakamoto T., Goto T., Kawada T. Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* - 2012. - V. 302. - № 2. - P. C463-72.
 170. Lee S.-L., Hsu E.-C., Chou C.-C., Chuang H.-C., Bai L.-Y., Kulp S. K., Chen C. Identification and characterization of a novel integrin-linked kinase inhibitor. // *J. Med. Chem.* - 2011. - V. 54. - № 18. - P. 6364–74.
 171. Lei J., Ingbar D. H. Src kinase integrates PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 pathways in T3-induced Na-K-ATPase activity in adult rat alveolar cells // *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* - 2011. - V. 301. - № 5. - P. L765–L771.
 172. Levin B. E., Triscari J., Marquet E., Sullivan A. C. Dietary obesity and neonatal sympathectomy. I. Effects on body composition and brown adipose // *Am. J. Physiol.* - Regul. Integr. Comp.

- Physiol. - 1984. - V. 16. - № 6pt2 - P R979-87.
173. Li M., Iismaa S. E., Naqvi N., Nicks A., Husain A., Graham R. M. Thyroid hormone action in postnatal heart development // *Stem Cell Res.* - 2014. - V. 13. - № 3. - P. 582–591.
 174. Lin H.-Y., Sun M., Tang H.-Y., Lin C., Luidens M. K., Mousa S. A., Incerpi S., Drusano G. L., Davis F. B., Davis P. J. L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase // *AJP Cell Physiol.* - 2009. - V. 296. - № 5. - P. C980–C991.
 175. Lin H., Shih A., Davis F. B., Davis P. J. Thyroid hormone promotes the phosphorylation of STAT3 and potentiates the action of epidermal growth factor in cultured cells // *Biochemistry.* - 1999. - V. 338. - P. 427–432.
 176. Lin H. Y., Davis F. B., Gordinier J. K., Martino L. J., Davis P. J. Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. // *Am. J. Physiol.* - 1999. - V. 276. - № 5. - P. C1014-24.
 177. Lin J., Zhang P., Huang Y., Wei X., Guo D., Liu J., Liu D., Deng Y., Xu B., Huang C., Yang X., Lu Y., Jia L., Zhang H. Elevated circulating gpmmb levels are associated with hyperthyroidism // *Endocr. Connect.* - 2020. - V. 9. - № 8. - P. 783–792.
 178. Liu K. L., Lo M., Canaple L., Gauthier K., Carmine P. Del, Beylot M. Vascular function of the mesenteric artery isolated from thyroid hormone receptor- α knockout mice // *J. Vasc. Res.* - 2014. - V. 51. - № 5. - P. 350–359.
 179. Liu M. Y., Hattori Y., Fukao M., Sato A., Sakuma I., Kanno M. Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle // *Br. J. Pharmacol.* - 2001. - V. 132. - № 5. - P. 1035–1046.
 180. Liu X., Zheng N., Shi Y. N., Yuan J., Li L. Thyroid hormone induced angiogenesis through the integrin $\alpha\beta 3$ /protein kinase D/histone deacetylase 5 signaling pathway // *J. Mol. Endocrinol.* - 2014. - V. 52. - № 3. - P. 245–254.
 181. Louzada R. A., Carvalho D. P. Similarities and differences in the peripheral actions of thyroid hormones and their metabolites // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* - 2018. - V. 9. - № JUL. - P. 394.
 182. Lozano-Cuenca J., López-Canales O. A., Aguilar-Carrasco J. C., Villagrana-Zesati J. R., López-Mayorga R. M., Castillo-Henkel E. F., López-Canales J. S. Pharmacological study of the mechanisms involved in the vasodilator effect produced by the acute application of triiodothyronine to rat aortic rings // *Brazilian J. Med. Biol. Res.* - 2016. - V. 49. - № 8. - P. 1–9.
 183. Luidens M. K., Mousa S. A., Davis F. B., Lin H. Y., Davis P. J. Thyroid hormone and angiogenesis // *Vascul. Pharmacol.* - 2010. - V. 52. - № 3–4. - P. 142–145.
 184. Machado B. H., Brody M. J. Mechanisms of pressor response produced by stimulation of

- nucleus ambiguus // *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* - 1990. - V. 259. - № 5pt2 - P. R955-62.
185. MacKenna D. A., Dolfi F., Vuori K., Ruoslahti E. Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts // *J. Clin. Invest.* - 1998. - V. 101. - № 2. - P. 301–310.
186. Magder S. The meaning of blood pressure // *Crit. Care.* - 2018. - V. 22. - № 1. - P. 257.
187. Mai W., Janier M. F., Allioli N., Quignodon L., Chuzel T., Flamant F., Samarut J. Thyroid hormone receptor alpha is a molecular switch of cardiac function between fetal and postnatal life. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2004. - V. 101. - № 28. - P. 10332–7.
188. Maia A. L., Kim B. W., Huang S. A., Harney J. W., Larsen P. R. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans // *J. Clin. Invest.* - 2005. - V. 115. - № 9. - P. 2524–2533.
189. Makino A., Wang H., Scott B. T., Yuan J. X.-J., Dillmann W. H. Thyroid hormone receptor- α and vascular function // *Am. J. Physiol. Physiol.* - 2012. - V. 302. - № 9. - P. C1346–C1352.
190. Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R. M. The nuclear receptor superfamily: The second decade // *Cell.* - 1995. - V. 288. - № 4. - P. C872–C880.
191. Manoury B., Etheridge S. L., Reid J., Gurney A. M. Organ culture mimics the effects of hypoxia on membrane potential, K⁺ channels and vessel tone in pulmonary artery // *Br. J. Pharmacol.* - 2009. - V. 158. - № 3. - P. 848–861.
192. Mark A. L., Abboud F. M., Schmid P. G., Heistad D. D., Mayer H. E. Differences in direct effects of adrenergic stimuli on coronary, cutaneous, and muscular vessels. // *J. Clin. Invest.* - 1972. - V. 51. - № 2. - P. 279–287.
193. Martin N. P., Marron Fernandez de Velasco E., Mizuno F., Scappini E. L., Gloss B., Erxleben C., Williams J. G., Stapleton H. M., Gentile S., Armstrong D. L. A rapid cytoplasmic mechanism for PI3 kinase regulation by the nuclear thyroid hormone receptor, TR β , and genetic evidence for its role in the maturation of mouse hippocampal synapses in vivo. // *Endocrinology.* - 2014. - V. 155. - № 9. - P. 3713–24.
194. Martin W. H., Korte E., Tolley T. K., Saffitz J. E. Skeletal muscle β -adrenoceptor distribution and responses to isoproterenol in hyperthyroidism // *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* - 1992. - V. 262. - № 4pt1 - P. E504-10.
195. Martinez-deMena R., Calvo R. M., Garcia L., Obregon M. J. Effect of glucocorticoids on the activity, expression and proximal promoter of type II deiodinase in rat brown adipocytes // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2016. - V. 428. - P. 58–67.
196. Martinez-deMena R., Hernández A., Obregón M. J. Triiodothyronine is required for the

- stimulation of type II 5'-deiodinase mRNA in rat brown adipocytes // *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* - 2002. - V. 282. - № 5. - P. E1119-27.
197. Mashina S. I., Medvedeva N. A., Medvedev O. S. The blood-perfused tail artery of the rat as a model for studying spontaneous vascular tonus // *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova.* - 1988. - V. 74. - № 9. - P. 1341–1344.
198. McAllister R. M., Delp M. D., Thayer K. A., Laughlin M. H. Muscle blood flow during exercise in sedentary and trained hypothyroid rats. // *Am. J. Physiol.* - 1995. - V. 269. - № 6 Pt 2. - P. H1949-54.
199. McAllister R. M., Grossenburg V. D., Delp M. D., Laughlin M. H. Effects of hyperthyroidism on vascular contractile and relaxation responses. // *Am. J. Physiol.* - 1998. - V. 274. - № 5 Pt 1. - P. E946-53.
200. McAllister R. M., Sansone J. C., Laughlin M. H. Effects of hyperthyroidism on muscle blood flow during exercise in rats // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* - 1995. - V. 268. - № 1pt2 - P. H330-5.
201. Melander A., Ericson L. E., Sundler F. Sympathetic regulation of thyroid hormone secretion // *Life Sci.* - 1974. - V. 14. - № 2. - P. 237–246.
202. Meng R., Tang H.-Y., Westfall J., London D., Cao J. H., Mousa S. a., Luidens M., Hercbergs A., Davis F. B., Davis P. J., Lin H.-Y. Crosstalk between integrin $\alpha\beta3$ and estrogen receptor- α is involved in thyroid hormone-induced proliferation in human lung carcinoma cells. // *PLoS One.* - 2011. - V. 6. - № 11. - P. e27547.
203. Mitsuhashi T., Tennyson G. E., Nikodem V. M. Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1988. - V. 85. - № 16. - P. 5804–5808.
204. Mizuma H., Murakami M., Mori M. Thyroid hormone activation in human vascular smooth muscle cells: Expression of type II iodothyronine deiodinase // *Circ. Res.* - 2001. - V. 88. - № 3. - P. 313–318.
205. Mizuno Y., Isotani E., Huang J., Ding H., Stull J. T., Kamm K. E. Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* - 2008. - V. 295. - № 2. - P. C358-64.
206. Mochizuki K., Yagi E., Sakaguchi N., Mochizuki H., Takabe S., Kuranuki S., Suzuki T., Shimada M., Goda T. The critical period for thyroid hormone responsiveness through thyroid hormone receptor isoform α in the postnatal small intestine // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* - 2007. - V. 1770. - № 4. - P. 609–616.
207. Moeller L. C., Cao X., Dumitrescu A. M., Seo H., Refetoff S. Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor β

- through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway // *Nucl. Recept. Signal.* - 2006. - V. 4. - № 1. - P. nrs.04020.
208. Moeller L. C., Dumitrescu A. M., Refetoff S. Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1 α and glycolytic genes // *Mol. Endocrinol.* - 2005. - V. 19. - № 12. - P. 2955–2963.
209. Mohácsik P. et al. A transgenic mouse model for detection of tissue-specific thyroid hormone action // *Endocrinology.* - 2018. - V. 159. - № 2. - P. 1159–1171.
210. Mondal S., Raja K., Schweizer U., Muges G. Chemistry and Biology in the Biosynthesis and Action of Thyroid Hormones. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* - 2016. - V. 55. - № 27. - P. 7606–30.
211. Moreno M., Berry M. J., Horst C., Thoma R., Goglia F., Harney J. W., Larsen P. R., Visser T. J. Activation and inactivation of thyroid hormone by type I iodothyronine deiodinase. // *FEBS Lett.* - 1994. - V. 344. - № 2–3. - P. 143–6.
212. Morimoto E., Kanai Y., Kim D. K., Chairoungdua A., Choi H. W., Wempe M. F., Anzai N., Endou H. Establishment and characterization of mammalian cell lines stably expressing human L-type amino acid transporters. // *J. Pharmacol. Sci.* - 2008. - V. 108. - № 4. - P. 505–16.
213. Morita T., Yamawaki H., Okada M., Hara Y. Contractile characteristics of rat mesenteric artery after organ culture. // *J. Vet. Med. Sci.* - 2010. - V. 72. - № 12. - P. 1621–7.
214. Mortimer R. H., Galligan J. P., Cannell G. R., Addison R. S., Roberts M. S. Maternal to fetal thyroxine transmission in the human term placenta is limited by inner ring deiodination. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 1996. - V. 81. - № 6. - P. 2247–2249.
215. Mousa S. A., Bergh J. J., Dier E., Rebbaa A., O'Connor L. J., Yalcin M., Aljada A., Dyskin E., Davis F. B., Lin H. Y., Davis P. J. Tetraiodothyroacetic acid, a small molecule integrin ligand, blocks angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor // *Angiogenesis.* - 2008. - V. 11. - № 2. - P. 183–190.
216. Mullem A. A. van, Gucht A. L. M. van, Visser W. E., Meima M. E., Peeters R. P., Visser T. J. Effects of thyroid hormone transporters MCT8 and MCT10 on nuclear activity of T3 // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2016. - V. 437. - P. 252–260.
217. Mullur R., Liu Y.-Y., Brent G. a. Thyroid hormone regulation of metabolism. // *Physiol. Rev.* - 2014. - V. 94. - № 2. - P. 355–82.
218. Mulvany M. J., Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats // *Circ. Res.* - 1977. - V. 41. - № 1. - P. 19–26.
219. Murakami M., Araki O., Hosoi Y., Kamiya Y., Morimura T., Ogiwara T., Mizuma H., Mori M. Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in human thyroid gland //

- Endocrinology. - 2001. - V. 142. - № 7. - P. 2961–2967.
220. Murányi A., MacDonald J. A., Deng J. T., Wilson D. P., Haystead T. A. J., Walsh M. P., Erdödi F., Kiss E., Wu Y., Hartshorne D. J. Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase // *Biochem. J.* - 2002. - V. 366. - № 1. - P. 211–216.
221. Napoli R., Guardasole V., Angelini V., Zarra E., Terracciano D., D'Anna C., Matarazzo M., Oliviero U., Macchia V., Saccà L. Acute effects of triiodothyronine on endothelial function in human subjects // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2007. - V. 92. - № 1. - P. 250–254.
222. Nilsson H., Goldstein M., Nilsson O. Adrenergic innervation and neurogenic response in large and small arteries and veins from the rat // *Acta Physiol. Scand.* - 1986. - V. 126. - № 1. - P. 121–133.
223. Ochsner S. A., McKenna N. J. No dataset left behind: mechanistic insights into thyroid receptor signaling through transcriptomic consensus meta-analysis. // *Thyroid.* - 2020. - V. 30. - № 4. - P. 621–639.
224. Ojamaa K., Klemperer J. D., Klein I. Acute effects of thyroid hormone on vascular smooth muscle // *Thyroid.* - 1996. - V. 6. - № 5. - P. 505–512.
225. Ortiga-Carvalho T. M., Chiamolera M. I., Pazos-Moura C. C., Wondisford F. E. Hypothalamus-pituitary-thyroid axis // *Compr. Physiol.* - 2016. - V. 6. - № 3. - P. 1387–1428.
226. Paquette M. A., Dong H., Gagné R., Williams A., Malowany M., Wade M. G., Yauk C. L. Thyroid hormone-regulated gene expression in juvenile mouse liver: Identification of thyroid response elements using microarray profiling and in silico analyses // *BMC Genomics.* - 2011. - V. 12. - P. 634.
227. Park K. W., Dai H. B., Ojamaa K., Lowenstein E., Klein I., Sellke F. W. The direct vasomotor effect of thyroid hormones on rat skeletal muscle resistance arteries. // *Anesth. Analg.* - 1997. - V. 85. - № 4. - P. 734–8.
228. Persad S., Attwell S., Gray V., Mawji N., Deng J. T., Leung D., Yan J., Sanghera J., Walsh M. P., Dedhar S. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: Critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343 // *J. Biol. Chem.* - 2001. - V. 276. - № 29. - P. 27462–27469.
229. Pesseme L., Lepourry L., Bouton K., Levin J., Cabello G., Wrutniak-Cabello C., Casas F. P28, a truncated form of TR α 1 regulates mitochondrial physiology // *FEBS Lett.* - 2014. - V. 588. - № 21. - P. 4037–4043.
230. Plateroti M., Gauthier K., Domon-Dell C., Freund J. N., Samarut J., Chassande O. Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TR α) and natural truncated TR Δ alpha isoforms in the control of intestine development. // *Mol. Cell. Biol.* - 2001. - V. 21. - № 14. - P. 4761–72.

231. Polte T. R., Eichler G. S., Wang N., Ingber D. E. Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* - 2004. - V. 286. - № 3 – P. C518-28.
232. Procopciuc L. M., Caracostea G., Hazi G., Nemeti G., Stamatian F. D2-Thr92Ala, thyroid hormone levels and biochemical hypothyroidism in preeclampsia // *Gynecol. Endocrinol.* - 2017. - V. 33. - № 2. - P. 136–140.
233. Qiu J., Zheng Y., Hu J., Liao D., Gregersen H., Deng X., Fan Y., Wang G. Biomechanical regulation of vascular smooth muscle cell functions: From in vitro to in vivo understanding // *J. R. Soc. Interface.* - 2014. - V. 11. - № 90. - P. 20130852.
234. Quesada A., Sainz J., Wangensteen R., Rodriguez-Gomez I., Vargas F., Osuna A. Nitric oxide synthase activity in hyperthyroid and hypothyroid rats // *Eur. J. Endocrinol.* - 2002. - V. 147. - № 1. - P. 117–122.
235. Rahmani M. A., Cheema I. R., Sen S., Peoples B., Riley S. R. The effect of hyperthyroidism and hypothyroidism on alpha 1- and alpha 2-adrenergic responsiveness in rat aortic smooth muscle. // *Artery.* - 1987. - V. 14. - № 6. - P. 362–383.
236. Ratajczak P. Expression and localization of caveolins during postnatal development in rat heart: implication of thyroid hormone // *J. Appl. Physiol.* - 2005. - V. 99. - № 1. - P. 244–251.
237. Robertson I. B., Rifkin D. B. Regulation of the bioavailability of TGF- β and TGF- β -related proteins // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* - 2016. - V. 8. - № 6. - P. a021907.
238. Rodriguez-Gomez I., Banegas I., Wangensteen R., Quesada A., Jimenez R., Gomez-Morales M., O'Valle F., Duarte J., Vargas F. Influence of thyroid state on cardiac and renal capillary density and glomerular morphology in rats // *J. Endocrinol.* - 2013. - V. 216. - № 1. - P. 43–51.
239. Rodríguez-Gómez I., Moliz J. N., Quesada A., Montoro-Molina S., Vargas-Tendero P., Osuna A., Wangensteen R., Vargas F. L-Arginine metabolism in cardiovascular and renal tissue from hyper- and hypothyroid rats. // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* - 2016. - V. 241. - № 5. - P. 550–6.
240. Romero-Calvo I., Ocón B., Martínez-Moya P., Suárez M. D., Zarzuelo A., Martínez-Augustin O., Medina F. S. de. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots // *Anal. Biochem.* - 2010. - V. 401. - № 2. - P. 318–320.
241. Rucci N., DiGiacinto C., Orrù L., Millimaggi D., Baron R., Teti A. A novel protein kinase C α -dependent signal to ERK1/2 activated by $\alpha v \beta 3$ integrin in osteoclasts and in Chinese hamster ovary (CHO) cells // *J. Cell Sci.* - 2005. - V. 118. - № 15. - P. 3263–3275.
242. Ruijter J. M., Ramakers C., Hoogaars W. M. H., Karlen Y., Bakker O., Hoff M. J. B. van den, Moorman A. F. M. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. // *Nucleic Acids Res.* - 2009. - V. 37. - № 6. - P. e45.
243. Sabatino L., Lubrano V., Balzan S., Kusmic C., Turco S. Del, Iervasi G. Thyroid hormone

- deiodinases D1, D2, and D3 are expressed in human endothelial dermal microvascular line: effects of thyroid hormones // *Mol. Cell. Biochem.* - 2015. - V. 399. - № 1–2. - P. 87–94.
244. Sabio J. M., Rodriguez-Maresca M., Luna J. D. D., García Del R Í O C., Vargas F. Vascular reactivity to vasoconstrictors in aorta and renal vasculature of hyperthyroid and hypothyroid rats // *Pharmacology.* - 1994. - V. 49. - № 4. - P. 257–264.
245. Salvatore D., Simonides W. S., Dentice M., Zavacki A. M., Larsen P. R. Thyroid hormones and skeletal muscle - New insights and potential implications // *Nat. Rev. Endocrinol.* - 2014. - V. 10. - № 4. - P. 206–214.
246. Samarakoon R., Chitnis S. S., Higgins S. P., Higgins C. E., Krepinsky J. C., Higgins P. J. Redox-Induced Src Kinase and Caveolin-1 Signaling in TGF- β 1-Initiated SMAD2/3 Activation and PAI-1 Expression // *PLoS One.* - 2011. - V. 6. - № 7. - P. e22896.
247. Samuel S., Zhang K., Tang Y.-D., Gerdes A. M., Carrillo-Sepulveda M. A. Triiodothyronine potentiates vasorelaxation via PKG/VASP signaling in vascular smooth muscle cells. // *Cell. Physiol. Biochem.* - 2017. - V. 41. - № 5. - P. 1894–1904.
248. Samuels H. H., Tsai J. S., Casanova J., Stanley F. Thyroid hormone action. In vitro characterization of solubilized nuclear receptors from rat liver and cultured GH1 cells // *J. Clin. Invest.* - 1974. - V. 54. - № 4. - P. 853–865.
249. Schmidt B. M. W., Martin N., Georgens A. C., Tillmann H. C., Feuring M., Christ M., Wehling M. Nongenomic cardiovascular effects of triiodothyronine in euthyroid male volunteers // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2002. - V. 87. - № 4. - P. 1681–1686.
250. Schneider M. J., Fiering S. N., Thai B., Wu S. Y., Germain E. St., Parlow A. F., Germain D. L. St., Galton V. A. Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (*Dio1*) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice // *Endocrinology.* - 2006. - V. 147. - № 1. - P. 580–589.
251. Schroeder A., Jimenez R., Young B., Privalsky M. L. The ability of thyroid hormone receptors to sense T4 as an agonist depends on receptor isoform and on cellular cofactors // *Mol. Endocrinol.* - 2014. - V. 28. - № 5. - P. 745–757.
252. Serfz Z., Vente J. De, Elekes K. Thyroid hormone level positively regulates nos and cgmp in the developing rat cerebellum // *Neuroendocrinology.* - 2009. - V. 89. - № 3. - P. 337–350.
253. Shvetsova A. A., Gaynullina D. K., Tarasova O. S., Schubert R. Negative feedback regulation of vasoconstriction by potassium channels in 10- to 15-day-old rats: Dominating role of Kv 7 channels. // *Acta Physiol. (Oxf).* - 2019. - V. 225. - № 2. - P. e13176.
254. Siegrist-Kaiser C. A., Juge-Aubry C., Tranter M. P., Ekenbarger D. M., Leonard J. L. Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes. A novel, extranuclear action of thyroid hormone. // *J. Biol. Chem.* - 1990. - V. 265. - № 9. - P. 5296–302.

255. Silva J. E., Larsen P. R. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue // *Nature*. - 1983. - V. 305. - № 5936. - P. 712–713.
256. Silva J. E., Larsen P. R. Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. // *J. Clin. Invest.* - 1985. - V. 76. - № 6. - P. 2296–2305.
257. Singh B. K., Sinha R. A., Yen P. M. Novel transcriptional mechanisms for regulating metabolism by thyroid hormone // *Int. J. Mol. Sci.* - 2018. - V. 19. - № 10. - P. 3284.
258. Singh G., Sharma A. C., Thompson E. B., Gulati A. Renal endothelin mechanism in altered thyroid states // *Life Sci.* - 1994. - V. 54. - № 24. - P. 1901–1908.
259. Sofronova S. I., Borzykh A. A., Gaynullina D. K., Kuzmin I. V., Shvetsova A. A., Lukoshkova E. V., Tarasova O. S. Endothelial nitric oxide weakens arterial contractile responses and reduces blood pressure during early postnatal development in rats // *Nitric Oxide*. - 2016. - V. 55–56. - P. 1–9.
260. 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 // *J. Endocrinol.* - 2017. - V. 235. - № 2. - P. 137-151.
261. Solter M., Tislarić D., Petric V., Pegan B. Relationship between T4, T3 and T4/T3 ratio in thyroid tissue, thyroid and peripheral veins in patients with nontoxic nodular goiter. // *Exp. Clin. Endocrinol.* - 1989. - V. 94. - № 3. - P. 305–12.
262. Somlyo A. P., Somlyo A. V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase // *Physiol. Rev.* - 2003. - V. 83. - № 4. - P. 1325–1358.
263. Song M., Song M. K., Choi H. S., Ryu J. C. Monitoring of deiodinase deficiency based on transcriptomic responses in SH-SY5Y cells // *Arch. Toxicol.* - 2013. - V. 87. - № 6. - P. 1103–1113.
264. Steinsapir J., Harney J., Larsen P. R. Type 2 iodothyronine deiodinase in rat pituitary tumor cells is inactivated in proteasomes // *J. Clin. Invest.* - 1998. - V. 102. - № 11. - P. 1895–1899.
265. Sterling K., Brenner M. A., Sakurada T. Rapid effect of triiodothyronine on the mitochondrial pathway in rat liver in vivo. // *Science*. - 1980. - V. 210. - № 4467. - P. 340–2.
266. Stoykov I., Zandieh-Doulabi B., Moorman a F. M., Christoffels V., Wiersinga W. M., Bakker O. Expression pattern and ontogenesis of thyroid hormone receptor isoforms in the mouse heart. // *J. Endocrinol.* - 2006. - V. 189. - № 2. - P. 231–45.
267. Streefkerk J. O., Hoogaars W. M. H., Christoffels V. M., Sand C., Pfaffendorf M., Peters S. L. M., Zwieten P. A. Van. Vasopressin-induced vasoconstriction is dependent on MAPK ERK1/2

- phosphorylation // *Fundam. Clin. Pharmacol.* - 2004. - V. 18. - № 1. - P. 45–50.
268. Takamizawa K., Hayashi K., Matsuda T. Isometric biaxial tension of smooth muscle in isolated cylindrical segments of rabbit arteries // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* - 1992. - V. 263. - № 1 32-1. - P. 30–34.
269. Tamajusuku A. S. K., Carrillo-Sepúlveda M. A., Braganhol E., Wink M. R., Sarkis J. J. F., Barreto-Chaves M. L. M., Battastini A. M. O. Activity and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 are increased by thyroid hormones in vascular smooth muscle cells // *Mol. Cell. Biochem.* - 2006. - V. 289. - № 1–2. - P. 65–72.
270. Taylor P. N., Albrecht D., Scholz A., Gutierrez-Buey G., Lazarus J. H., Dayan C. M., Okosieme O. E. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism // *Nat. Rev. Endocrinol.* - 2018. - V. 14. - № 5. - P. 301–316.
271. Thijssen-Timmer D. C., Schiphorst M. P. Ter, Kwakkel J., Emter R., Kralli A., Wiersinga W. M., Bakker O. PGC-1 α regulates the isoform mRNA ratio of the alternatively spliced thyroid hormone receptor α transcript // *J. Mol. Endocrinol.* - 2006. - V. 37. - № 2. - P. 251–257.
272. Toba K., Crofton J. T., Inoue M., Share L. Effects of vasopressin on arterial blood pressure and cardiac output in male and female rats // *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* - 1991. - V. 261. - № 5pt2. - P. 251–257. – P. R1118-25.
273. Toral M., Jimenez R., Montoro-Molina S., Romero M., Wangensteen R., Duarte J., Vargas F. Thyroid hormones stimulate L-arginine transport in human endothelial cells // *J. Endocrinol.* - 2018. - V. 239. - № 1. - P. 49–62.
274. Toyoda N., Zavacki A. M., Maia A. L., Harney J. W., Larsen P. R. A novel retinoid X receptor-independent thyroid hormone response element is present in the human type 1 deiodinase gene. // *Mol. Cell. Biol.* - 1995. - V. 15. - № 9. - P. 5100–12.
275. Toyoda N., Yasuzawa-Amano S., Nomura E., Yamauchi A., Nishimura K., Ukita C., Morimoto S., Kosaki A., Iwasaka T., Harney J. W., Larsen P. R., Nishikawa M. Thyroid hormone activation in vascular smooth muscle cells is negatively regulated by glucocorticoid // *Thyroid.* - 2009. - V. 19. - № 7. - P. 755–763.
276. Tsujimoto G., Hashimoto K. A unique pressor response to isoprenaline in the pithed rat during triiodo-l-thyronine (T3)-induced hyperthyroidism // *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* - 1986. - V. 334. - № 2. - P. 138–144.
277. Tuca A., Giralt M., Villarroya F., Viñas O., Mampel T., Iglesias R. Inhibition of iodothyronine 5'-deiodinase by iopanoic acid does not block nuclear T3 accumulation during rat fetal development. // *Pediatr. Res.* - 1994. - V. 35. - № 1. - P. 91–5.
278. Uzair I. D., Grand J. C., Flamini M. I., Sanchez A. M. Molecular actions of thyroid hormone on breast cancer cell migration and invasion via cortactin/n-WASP // *Front. Endocrinol. (Lausanne).*

- 2019. - V. 10. - № MAR. - P. 139.
279. van der Spek A. H., Fliers E., Boelen A. The classic pathways of thyroid hormone metabolism // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2017. . - V. 458. - P. 29–38.
280. Vargas F., Moreno J. M., Rodríguez-Gómez I., Wangensteen R., Osuna A., Alvarez-Guerra M., García-Estañ J. Vascular and renal function in experimental thyroid disorders // *Eur. J. Endocrinol.* - 2006. - V. 154. - № 2. - P. 197–212.
281. Vasudevan N., Ogawa S., Pfaff D. Estrogen and thyroid hormone receptor interactions: physiological flexibility by molecular specificity. // *Physiol. Rev.* - 2002. - V. 82. - № 4. - P. 923–944.
282. Vella K. R., Hollenberg A. N. The actions of thyroid hormone signaling in the nucleus // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2017. - V. 458. - P. 127–135.
283. Vezyraki P., Kalfakakou V., Evangelou A. Atrial natriuretic peptide and thyroid hormones' relation to plasma and heart calcium and magnesium concentrations of Wistar rats exposed to cold and hot ambients // *Biol. Trace Elem. Res.* - 2000. - V. 73. - № 2. - P. 163–173.
284. Visser T. J., Kaptein E., Terpstra O. T., Krenning E. P. Deiodination of thyroid hormone by human liver. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 1988. - V. 67. - № 1. - P. 17–24.
285. Vries E. M. De, Kwakkel J., Eggels L., Kalsbeek A., Barrett P., Fliers E., Boelen A. NFκB signaling is essential for the lipopolysaccharide-induced increase of type 2 deiodinase in tancytes // *Endocrinology.* - 2014. - V. 155. - № 5. - P. 2000–2008.
286. Wagner M. S., Morimoto R., Dora J. M., Benneman A., Pavan R., Maia A. L. Hypothyroidism induces type 2 iodothyronine deiodinase expression in mouse heart and testis // *J. Mol. Endocrinol.* - 2003. - V. 31. - № 3. - P. 541–550.
287. Wang K., Sun Y., Liu J., Yan Y., Chen Z. Type 1 iodothyronine deiodinase activity and mRNA expression in rat thyroid tissue with different iodine intakes. // *Chin. Med. J. (Engl).* - 2006. - V. 119. - № 22. - P. 1899–903.
288. Wang X., Sun Z. Thyroid hormone induces artery smooth muscle cell proliferation: Discovery of a new TRα1-Nox1 pathway // *J. Cell. Mol. Med.* - 2010. - V. 14. - № 1–2. - P. 368–380.
289. Warner A., Rahman A., Solsjö P., Gottschling K., Davis B., Vennström B., Arner A., Mittag J. Inappropriate heat dissipation ignites brown fat thermogenesis in mice with a mutant thyroid hormone receptor α1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2013. - V. 110. - № 40. - P. 16241–16246.
290. Wasco E. C., Martinez E., Grant K. S., Germain E. A. St., Germain D. L. St., Galton V. A. Determinants of iodothyronine deiodinase activities in rodent uterus // *Endocrinology.* - 2003. - V. 144. - № 10. - P. 4253–4261.
291. Webb R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. // *Adv. Physiol. Educ.* - 2003. - V. 27. -

- № 1–4. - P. 201–6.
292. Weitzel J. M., Alexander Iwen K. Coordination of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2011. - V. 342. - № 1–2. - P. 1–7.
293. Wenceslau C. F. et al. Guidelines for the measurement of vascular function and structure in isolated arteries and veins // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* - 2021. - V. 321. - № 1. - P. H77–H111.
294. Wikström L., Johansson C., Saltó C., Barlow C., Barros A. C., Baas F., Forrest D., Thorén P., Vennström B. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor $\alpha 1$ // *EMBO J.* - 1998. - V. 17. - № 2. - P. 455–461.
295. Williams G. R. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. // *Mol. Cell. Biol.* - 2000. - V. 20. - № 22. - P. 8329–42.
296. Wills K. N., Zhang X. K., Pfahl M. Coordinate expression of functionally distinct thyroid hormone receptor α isoforms during neonatal brain development // *Mol. Endocrinol.* - 1991. - V. 5. - № 8. - P. 1109–1119.
297. Wilson D. P., Sutherland C., Borman M. A., Deng J. T., MacDonald J. A., Walsh M. P. Integrin-linked kinase is responsible for Ca^{2+} -independent myosin diphosphorylation and contraction of vascular smooth muscle // *Biochem. J.* - 2005. - V. 392. - № 3. - P. 641–648.
298. Wittmann G., Szabon J., Mohácsik P., Nouriel S. S., Gereben B., Fekete C., Lechan R. M. Parallel regulation of thyroid hormone transporters OATP1c1 and MCT8 during and after endotoxemia at the blood-brain barrier of male rodents // *Endocrinology.* - 2015. - V. 156. - № 4. - P. 1552–1564.
299. Xiong J.-P., Stehle T., Zhang R., Joachimiak A., Frech M., Goodman S. L., Arnaout M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha V\beta 3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand // *Science.* - 2002. - V. 296. - № 5565. - P. 151–5.
300. Yang C. M., Lin M. I., Hsieh H. L., Sun C. C., Ma Y. H., Hsiao L. Der. Bradykinin-induced p42/p44 MAPK phosphorylation and cell proliferation via Src, EGF receptors, and PI3-K/Akt in vascular smooth muscle cells // *J. Cell. Physiol.* - 2005. - V. 203. - № 3. - P. 538–546.
301. Yasuzawa-Amano S., Toyoda N. Expression and regulation of type 2 iodothyronine deiodinase in rat aorta media // *Endocrinology.* - 2004. - V. 145. - № February. - P. 5638–5645.
302. Yoneda K., Takasu N., Higa S., Oshiro C., Oshiro Y., Shimabukuro M., Asahi T. Direct effects of thyroid hormones on rat coronary artery: nongenomic effects of triiodothyronine and thyroxine. // *Thyroid.* - 1998. - V. 8. - № 7. - P. 609–13.
303. Yoshida T., Gong J., Xu Z., Wei Y., Duh E. J. Inhibition of pathological retinal angiogenesis by the integrin $\alpha\beta 3$ antagonist tetraiodothyroacetic acid (tetrac) // *Exp. Eye Res.* - 2012. - V. 94. - № 1. - P. 41–48.

304. Yousefzadeh N., Jeddi S., Ghasemi A. Impaired cardiovascular function in male rats with hypo- and hyperthyroidism: involvement of imbalanced nitric oxide synthase levels. // *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*. - 2021. - V. 21. - № 3. - P. 526–533.
305. Zamorano B., Bruzzone M. E., Martinez J. L. Influence of the estrous cycle on the norepinephrine-induced contraction of rat aorta: Relationship to vascular prostanoids biosynthesis // *Biol. Res*. - 1994. - V. 27. - № 3–4. - P. 209–215.
306. Zanatta A. P., Zanatta L., Gonçalves R., Zamoner A., Silva F. R. M. B. Integrin participates in the effect of thyroxine on plasma membrane in immature rat testis // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj*. - 2013. - V. 1830. - № 3. - P. 2629–2637.
307. Zavaritskaya O., Lubomirov L. T., Altay S., Schubert R. Src tyrosine kinases contribute to serotonin-mediated contraction by regulating calcium-dependent pathways in rat skeletal muscle arteries // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol*. - 2017. - V. 469. - № 5–6. - P. 767–777.
308. Zeller K. S., Riaz A., Sarve H., Li J., Tengholm A., Johansson S. The role of mechanical force and ROS in integrin-dependent signals. // *PLoS One*. - 2013. - V. 8. - № 5. - P. e64897.
309. Zhang C., Hein T. W., Wang W., Miller M. W., Fossum T. W., McDonald M. M., Humphrey J. D., Kuo L. Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. // *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*. - 2004. - V. 44. - № 6. - P. 935–43.
310. Zheng J.-P., Zhang X., Wang H., Wang Y., Cheng Z., Yin P., Peng W. Vasomotor dysfunction in the mesenteric artery after organ culture with cyclosporin a // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. - 2013. - V. 113. - № 6. - P. 370–376.
311. Zhu X. G., Hanover J. A., Hager G. L., Cheng S. Y. Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera // *J. Biol. Chem*. - 1998. - V. 273. - № 42. - P. 27058–27063.
312. Zwaveling J., Pfaffendorf M., Zwieter P. A. van. The direct effects of thyroid hormones on rat mesenteric resistance arteries. // *Fundam. Clin. Pharmacol*. - 1997. - V. 11. - № 1. - P. 41–6.