

УДК 612.833.8

## **ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ, СВЯЗАННЫЕ С НАРУШЕНИЕМ ОБМЕНА КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ ПОЧЕЧНОЙ ТКАНИ У КРЫС СО СПОНТАННОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ\***

**А.С. Альдекеева, Н.З. Ключева, Ю.С. Крайнова**  
Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

В данной работе представлены результаты изучения обмена белка NAP-22 в почках крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR). При помощи методов ПЦР в реальном времени были исследованы уровни экспрессии мРНК данного белка в корковом и мозговом слоях, а также в целостном сегменте почки в раннем постнатальном онтогенезе (5, 13, 18 и 30 дней) и у взрослых животных (90 дней). Использовали по 10 самцов каждой линии. Также на взрослых самцах обеих линий изучалось влияние на уровень экспрессии мРНК NAP-22 повышенного потребления хлорида натрия в течение трех недель. В раннем постнатальном онтогенезе у крыс линии SHR по сравнению нормотензивным контролем (крысы линии WKY) были обнаружены различия, уровень экспрессии мРНК NAP-22 у крыс линии SHR в корковом и мозговом слоях почек был выше. У взрослых животных межлинейные различия также наблюдались, но уровень экспрессии мРНК NAP-22 у крыс линии SHR в корковом и мозговом слоях почек был ниже, чем у крыс линии WKY. Наше исследование позволяет рассматривать белок NAP-22, мажорный субстрат ПКС, как перспективный маркер ряда заболеваний, экспериментальной моделью которых являются крысы линии SHR. Работа выполнена с использованием животных из биоколлекции ИФ РАН.

**Ключевые слова:** SHR, WKY, NAP-22, NaCl.

DOI: 10.26456/vtbio115

**Введение.** В настоящее время доказано, что крысы со спонтанной гипертензией отличаются от своего нормотензивного контроля (крысы линии WKY) не только уровнем артериального давления, различия между этими двумя линиями животных кроются гораздо глубже. В последнее время собраны убедительные

---

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013-2020 годы (ГП-14, раздел 65.2).

доказательства того, что у крыс со спонтанной гипертензией выявляются разнообразные изменения внутриклеточных молекулярных процессов. Кроме хорошо изученных нарушений обмена ионов кальция в клетке (Cox, Rusch, 2002), у них обнаружены изменения в поведенческих реакциях, позволяющие использовать этих животных как ценную модель широко распространенного нейropsychологического заболевания - синдрома дефицита внимания с гиперактивностью у детей (СДВГ). У крыс со спонтанной гипертензией обнаружены существенные различия в функционировании группы генов, названной IMAGE - выявленной в рамках международного многоцентрового исследования (Kuntsi et al., 2006). Изменения в части этих генов ведут к нарушению взаимодействия между глутаматными рецепторами (NMDA и AMPA) и глутаматом, что существенно изменяет синаптическую пластичность в различных участках головного мозга, например, в стриатуме и гиппокампе (DasBanerjee et al., 2008; Laurin et al., 2008). Гены белков, связанные с ионотропными NMDA-глутаматными и другими рецепторами, демонстрируют снижение уровня экспрессии. Многие белки, участвующие в этих реакциях, связаны с функционированием норадреналина, который связан с двумя системами вторичных мессенджеров, а именно с аденилатциклазой и с кальциевыми каскадами передачи внутриклеточного сигнала (через фосфолипазу C). Для некоторых других генов крыс линии SHR, связанных с AMPA-рецепторами и с обменом кальмодулина, характерна гиперэкспрессия. Эти генетически детерминированные нарушения обмена группы белков у крыс со спонтанной гипертензией ведут к появлению дисбаланса в реализации молекулярных механизмов, отвечающих за передачу внутриклеточной информации. Возможно, что у крыс линии SHR могут также наблюдаться отклонения в обмене других белков, например, мажорных субстратов протеинкиназы C, которые, в свою очередь, встречаются не только в мозге. Поэтому большой интерес представляет изучение особенностей экспрессии мРНК таких белков не только в структурах ЦНС, но и в других органах и тканях.

Так как крысы линии SHR являются общепринятой экспериментальной моделью таких заболеваний, как артериальная гипертензия и СДВГ, которые развиваются уже в раннем возрасте, представляет большой интерес обнаружение группы белков, которые можно было бы зарегистрировать в пробах крови и использовать для раннего выявления целой группы заболеваний. Мы исследовали особенности обмена белков - мажорных субстратов протеинкиназы C (ПКС) у крыс линии SHR в структурах ЦНС и в почках. Среди этих белков GAP-43 является нейроспецифическим, а белки NAP-22 и MARCKS обнаруживаются и в других органах и тканях, например, в

почках. Полученные различия в уровне экспрессии мРНК белка NAR-22 у крыс линии SHR и WKY в постнатальном онтогенезе, предполагают возможное наличие различий и у взрослых животных. Следовательно, ген белка NAR-22, мажорного субстрата протеинкиназы С, можно рассматривать в качестве кандидата в группу генов IMAGE, а изменение его обмена можно использовать для выявления молекулярных нарушений, характерных для СДВГ и артериальной гипертензии. Особый интерес представляет динамика обмена белка NAR-22 у животных в процессе постнатального онтогенеза, так как повышенное давление и изменения в процессах передачи внутриклеточного сигнала у спонтанно-гипертензивных животных окончательно формируются и усиливаются по мере взросления.

Нарушение работы почек - один из главных механизмов в патогенезе артериальной гипертензии (АГ). Вопрос о том, что при этом первично - нарушения перфузии клубочкового аппарата или же внутриклеточные процессы в подоцитах гломерулярного аппарата и гладкомышечных клеток (ГМК) почечных артерий, непосредственно не связанных с уровнем мышечного тонуса, остаётся открытым. Поэтому нами был исследован белок NAR-22 в корковом (где сосредоточены ГМК клубочкового аппарата и подоциты) и мозговом (где сосредоточены эпителиальные клетки, ответственные за обменные процессы) слоях почки в раннем постнатальном онтогенезе (в возрасте 5, 13, 18, 30 дней), то есть в период до начала формирования стойкой АГ.

Исследуемый белок ассоциирован с цитоскелетом (*Widmer et al., 1990*), миристоилирован, в тканях почек локализован в ядре, возможно, его клеточная локализация и экспрессия зависят от типа клеток (*Carpenter et al., 2004*).

Хорошо изученный белок-супрессор опухоли Вильмса WT1, часто мутирующий при опухолях почек у детей (*Rivera, Haber, 2005*) и, возможно, являющийся активатором или супрессором транскрипции (*Roberts, 2005*) может взаимодействовать с белком NAR-22, который в этом случае функционирует как транскрипционный косупрессор WT1 (*Carpenter et al., 2004*). Оба этих белка сосредоточены в подоцитах почки взрослых животных, что позволяет использовать уровень экспрессии мРНК NAR-22 в качестве показателя, связанного с патологическими изменениями в почках, в том числе связанными с изменениями сосудистого тонуса (*Антонова и др. 2011*).

**Методика.** Работа выполнена на помётах крыс линии SHR и их нормотензивного контроля - крыс линии WKY, в возрасте 5, 13, 18 и 30 дней, а также на взрослых самцах крыс обеих линий (по 10 животных каждой линии).

Для определения уровня экспрессии мРНК белка NAP-22 животные были декапитированы под легким эфирным наркозом с последующим забором образцов ткани почек (корковый слой, мозговой слой и сегмент). Из полученных образцов ткани крыс обеих линий была выделена валовая мРНК с помощью набора Quick-RNA™ MiniPrep Kit (ZymoResearch, США) согласно протоколу исследования. Далее был осуществлен синтез комплементарной ДНК посредством обратной транскрипции. Уровни экспрессии мРНК NAP-22 и GAP-43 определяли методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе АНК-32 (ИАП РАН, Россия). В качестве референса для нормировки результатов амплификации использовали ген  $\beta$ -актина. Условия проведения ПЦР: 1. 95<sup>0</sup> С 300 с – 1 цикл; 2. 60<sup>0</sup> С 40 с, 95<sup>0</sup> С 15 с – 50 циклов. Количественное выражение результатов проводилось с помощью расчета разницы экспрессии исследуемого гена относительно нормировочного гена по формуле  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

Разницу в экспрессии мРНК оценивали по методу Стьюдента с использованием стандартного программного обеспечения. Значимыми считали различия, вероятность которых превосходила 95 %. Для усреднения параметрических признаков использованы средние и ошибки среднего.

Работа выполнена с использованием животных из биобанка ИФ РАН, при проведении экспериментов соблюдались все требования комиссии по контролю по содержанию и использованию лабораторных животных при Институте физиологии им И.П. Павлова РАН. Это исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации, Международными стандартами по работе с лабораторными животными, и с разрешения комиссии по биоэтике ФГБУН «Институт физиологии имени И.П. Павлова» РАН.

**Результаты и обсуждение.** На рисунке 1 представлены данные по уровням экспрессии мРНК NAP-22 у крыс линий SHR и WKY в почках в постнатальном онтогенезе. По мере развития артериальной гипертензии у крыс линии SHR проявлялись межлинейные и морфофункциональные различия по сравнению с нормотензивным контролем (крысы линии WKY). На 18 и 30 дни в корковом веществе уровень экспрессии мРНК NAP-22 был достоверно выше, а в мозговом слое эти различия фиксировались уже на 13 день и сохранялись для всех последующих исследуемых возрастов.

На рисунке 2 показаны данные, полученные у взрослых животных. В этом случае уровень экспрессии мРНК NAP-22 также определялся в различных слоях. Оказалось, что у крыс линии WKY уровень экспрессии мРНК NAP-22 в корковом и мозговом веществе был выше, чем у крыс линии SHR. Это доказывает, что послойные нарушения внутриклеточных процессов у крыс линии SHR сохраняются и во

взрослом возрасте на фоне уже сформировавшейся артериальной гипертензии. В то же время, на целом сегменте нам не удалось выявить межлинейных различий для этого показателя.

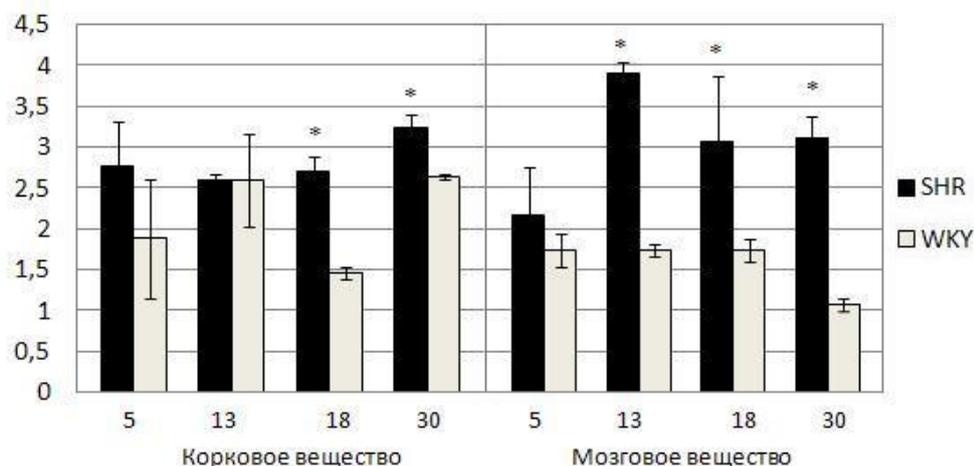


Рис. 1. Уровень экспрессии мРНК NAP-22 (в относительных единицах) в корковом и мозговом веществе почек крыс линий SHR и WKY в постнатальном онтогенезе. Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ( $M \pm m$ ). \* обозначены статистически достоверные межлинейные различия ( $p < 0,05$ )

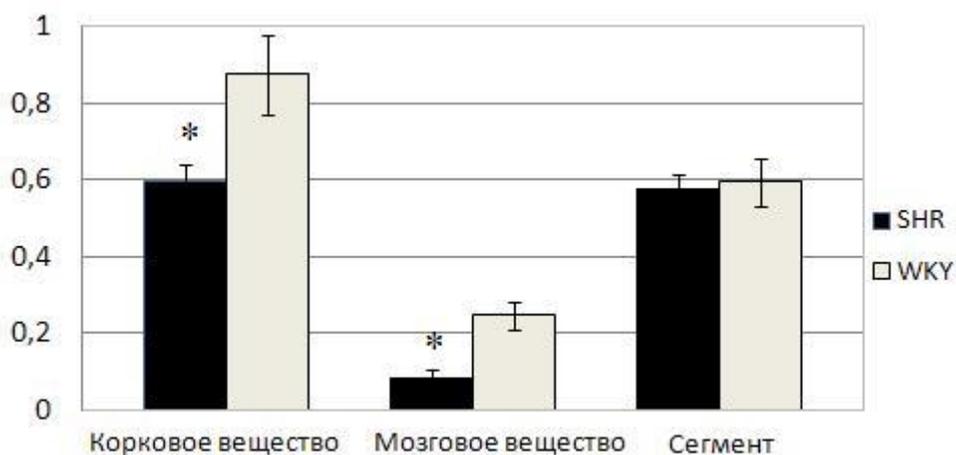


Рис. 2. Уровень экспрессии мРНК NAP-22 (в относительных единицах) в корковом, мозговом веществе и сегменте почек крыс линий SHR и WKY. Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ( $M \pm m$ ). \* обозначены статистически достоверные межлинейные различия ( $p < 0,05$ )

На рисунке 3 представлены изменения уровня экспрессии мРНК NAP-22 в почках при действии диетарного фактора – повышенного потребления NaCl, играющего важнейшую роль в формировании и протекании гипертонической болезни. Это позволяло оценить реакцию обмена белков – основных субстратов ПКС при воздействии на крыс линии SHR и линии WKY важнейшего в патогенезе артериальной гипертензии фактора внешней среды. Необходимо было выяснить, являются ли межлинейные различия этих факторов стабильными или же они могут быть чувствительны к специфическим патогенетическим стимулам. На основании этого можно было бы судить о степени вовлечения таких молекулярных изменений в процессы формирования молекулярных и функциональных изменений в ходе развития связанных кальцием патологий, самой подходящей экспериментальной моделью которых являются крысы со спонтанной гипертензией.

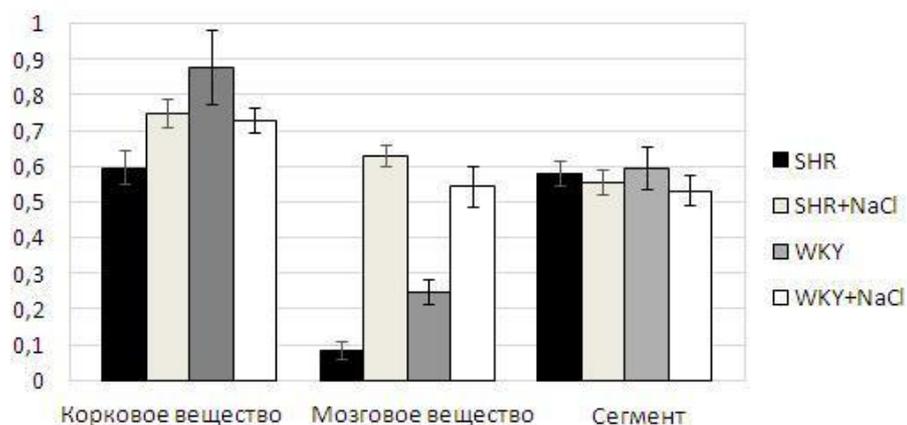


Рис. 3 Уровни экспрессии мРНК NAP-22 (в относительных единицах) в корковом, мозговом веществе и сегменте почек крыс линий SHR и WKY до и после солевой нагрузки. Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ( $M \pm m$ ).

В настоящее время сформировались устойчивые представления о том, что заболевания, моделью которых являются крысы со спонтанной гипертензией, связаны со сложным комплексом молекулярных отклонений и нарушений, которые проявляются в соответствующих симптомах, причем эти механизмы не исчерпываются исключительно подъемом артериального давления. Больше всего видоизменяются механизмы регуляции в центральной нервной системе. У крыс со спонтанной гипертензией обнаружены существенные различия в функционировании генов. Изменения экспрессии и функционирования некоторых таких генов вызывают дефектные взаимодействия между глутаматными рецепторами (NMDA

и AMPA) и глутаматом, что существенно меняет синаптическую пластичность в различных участках головного мозга, например, в стриатуме и гиппокампе (DasBanerjee et al., 2008; Laurin et al., 2008). Гены белков, связанных с глутамантными рецепторами, проявляют снижение уровня экспрессии ионотропных NMDA-рецепторов, которым принадлежит основная роль в реализации процессов возбуждения в системах ЦНС. В то же время и сами молекулы белков-рецепторов демонстрируют выраженные функциональные нарушения. Для ряда других генов, связанных с AMPA-рецепторами и с обменом кальцием, крысы линии SHR демонстрируют гиперэкспрессию. Это доказывает важнейшую роль глутаматной системы регуляции и происходящих в ней нарушений в развитии СДВГ. Нарушения работы этой медиаторной системы головного мозга напрямую связаны с реализацией соответствующих симптомов (Lehohla, 2003). Многочисленные доказательства свидетельствуют, что эти молекулярные (генетически детерминированные) нарушения развиваются уже в раннем возрасте еще до проявления самого СДВГ. Поэтому соответствующий генетический анализ этих структур не только позволит понять, каким образом возникает синдром и каковы пути его лечения и профилактики, но и использовать обнаруженные изменения в структуре соответствующих рецепторов в качестве маркеров ранней диагностики. При этом возникают следующие ограничения: поскольку эти разные типы рецепторов и соответствующих белков локализованы преимущественно в головном мозге, и невозможно использовать анализ их изменений (структурных и функциональных), так как для этого требуется биопсия тканей соответствующих структур головного мозга. Наши многолетние исследования показали, что межлинейные различия наблюдаются не только у группы белков, гены которых входят в группу IMAGE, но и у белков, являющихся мажорными субстратами ПКС. Функционирование этих белков, так же, как и уровень активности самой ПКС, сильно зависит от уровня кальция в клетке. А крысы линии SHR имеют ряд генетически детерминированных нарушений в системе поддержания кальциевого гомеостаза в клетке и повышенный уровень ионов кальция в цитозоле, что объясняет полученные результаты.

**Заключение.** Исследования, проведенные на почках крыс со спонтанной гипертензией, показали, что, в отличие от других белков группы IMAGE, белок NAP-22 на фоне генетически детерминированных нарушений обмена кальция в клетках у животных этой линии демонстрируют изменение своего обмена не только в ЦНС, но и в других органах и тканях. Это делает белок NAP-22 возможным кандидатом на роль молекулярного маркера разветвленных взаимосвязанных изменений внеклеточных и внутриклеточных

каскадов передачи информации у крыс линии SHR. Кроме того, изменения этого белка можно использовать в качестве показателя реакций, опосредующих влияние на организм различных факторов внешней среды, например, таких, как недостаточное поступление экзогенного кальция и избыточное поступление хлорида натрия (солевая нагрузка), а также других воздействий, например, уровень стресса, пренатальная гипоксия и так далее. Белок NAP-22 также может обнаруживаться и в клетках крови, что делает его перспективным диагностическим маркером ряда заболеваний, экспериментальной моделью которых являются крысы линии SHR.

### **Список литературы**

- Антонова О.С., Плеханов А. Ю., Петрова Е.А.* 2011. Структурные изменения белка NAP-22 - основного субстрата протеинкиназы C – при кальций-зависимых формах артериальной гипертензии // *Артериальная гипертензия*. Т. 17. № 4. С. 342-346.
- Cox R.H., Rusch N.J.* 2002. New expression profiles of voltage-gated ion channels in arteries exposed to high blood pressure // *Microcirculation*. Т. 9. №. 4. P. 243-257.
- Carpenter B., Hill K.J., Charalambous M., Wagner K.J.* 2004. BASP1 is a transcriptional cosuppressor for the Wilms' tumour suppressor protein WT1 // *Mol. Cell. Biol.* V. 24. P. 537-549.
- DasBanerjee T., Middleton F.A., Berger D.F., Lombardo J.P., Sagvolden T., Faraone S.V.* 2008. A comparison of molecular alterations in environmental and genetic rat models of ADHD: a pilot study // *Am J Medical Genet B Neuropsychiatr Genet.* V. 147B. P. 1554-1563.
- Kuntsi J., Neale B.M., Chen W., Faraone S.V., Asherson P.* 2006. The IMAGE project: methodological issues for the molecular genetic analysis of ADHD // *Behav Brain Funct.* V. 2. P. 27.
- Laurin N., Ickowicz A., Pathare T., Malone M., Tannock R., Schachar R., Kennedy J.L., Barr C.L.* 2008. Investigation of the G protein subunit Galphao1f gene (GNAL) in attention deficit/hyperactivity disorder // *J. Psychiatr. Res.* V. 42. P. 117-124.
- Lehohla M., Kellaway L., Russell V.A.* 2004. NMDA receptor function in the prefrontal cortex of a rat model for attention-deficit hyperactivity disorder // *Metabolic brain disease.* V. 19. № 1-2. P. 35-42.
- Rivera M.N., Haber D.A.* 2005. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney // *Nat. Rev. Cancer.* V. 5. P. 699-712.
- Roberts S.G.E.* 2005. Transcriptional regulation by WT1 in development // *Curr. Opin. Genet. Dev.* V. 15. P. 542-547.
- Widmer F., Caroni P.,* 1990. Identification, localization, and primary structure of CAP-23, a particle-bound cytosolic protein of early development // *J. Cell. Biol.* V. 111(6 Pt 2). P. 3035-3047.

## **PHYSIOLOGICAL MECHANISMS ASSOCIATED WITH IMPAIRED CALCIUM METABOLISM IN KIDNEY OF RATS WITH SPONTANEOUS HYPERTENSION**

**A.S. Aldekeeva, N.Z. Klyueva, Y.S. Kraynova**

Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg

This paper presents the results of a study of the metabolism of NAP-22 protein in kidneys of rats with spontaneous hypertension (SHR strand), compared with normotensive parent strand rats (WKY). Real-time PCR methods were used to study the levels of NAP-22 mRNA expression in cortical and medullar layers, as well as in the whole kidney segment, in early postnatal ontogenesis (5, 13, 18 and 30 days old), as well as in adult animals (90 days old). In addition, the effect of increased sodium chloride consumption for three weeks on NAP-22 mRNA expression level was studied in adult males of both strands. In early postnatal ontogenesis, we detected the higher level of NAP-22 mRNA expression in cortical and medullar kidney layers of SHR strand rats, as compared with normotensive control. Interstrand differences were also observed in cortical and medullar kidney layers of adult animals, but this time, NAP-22 mRNA expression level in SHR strand rats was lower than in WKY strand animals. Our study allows us to consider the protein NAP-22, a major substrate of PKC, as a promising marker of a number of diseases, the experimental model of which are SHR rats. The study was performed using animals from Pavlov Institute Biological Collection.

**Keywords:** *SHR, WKY, NAP-22, NaCl.*

### *Об авторах:*

АЛЬДЕКЕЕВА Анна Сергеевна – младший научный сотрудник в группе экспериментальной кардиологии ФБГУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6, e-mail: [kardio\\_lab@mail.ru](mailto:kardio_lab@mail.ru).

КЛЮЕВА Наталия Зиновьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, руководитель группы экспериментальной кардиологии ФБГУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6, e-mail: [natklueva@mail.ru](mailto:natklueva@mail.ru).

КРАЙНОВА Юлия Сергеевна – младший научный сотрудник в группе экспериментальной кардиологии ФБГУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6, e-mail: [kardio\\_lab@mail.ru](mailto:kardio_lab@mail.ru).

Альдекеева А.С. Физиологические механизмы, связанные с нарушением обмена кальция в клетках почечной ткани у крыс со спонтанной гипертензией / А.С. Альдекеева, Н.З. Ключева, Ю.С. Крайнова // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2019. № 4(56). С. 15-23.