

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

Альдекеева Анна Сергеевна

**Особенности метаболизма белков – мажорных субстратов
протеинкиназы С в почках крыс со спонтанной гипертензией**

03.03.01 – физиология

Научный руководитель: к.б.н. Ключева Н.З.

Санкт-Петербург

2019

Актуальность проблемы

Проблема формирования артериальной гипертензии и гипертонической болезни (ГБ) остается магистральной для медицины и физиологии на протяжении более 100 лет. Несмотря на огромный прогресс в понимании патогенеза ГБ, это заболевание все еще остается широко распространенным, что требует разработки новых подходов к его раннему выявлению и оценки факторов, способствующих его развитию, что тесно связано с общим прогрессом в понимании механизмов функционирования основных физиологических систем, в первую очередь, сердечно-сосудистой и выделительной, и тех структур, которые обеспечивают их регуляцию.

Развитию эффективности исследований, посвященных проблеме гипертонии, способствует работа с экспериментальной моделью, позволяющей изучить патогенез ГБ, а именно, с крысами со спонтанной гипертензией (линия SHR). У таких животных гипертензия развивается в течение 6 недель от рождения и полностью формируется в возрасте от 12 до 16 недель. Крысы линии SHR также являются наиболее распространенной экспериментальной моделью нарушений обмена внутриклеточного кальция являются (Kantaketal., 2008). У них показаны существенные нарушения механизмов, обеспечивающих постоянство концентрации ионов кальция в цитоплазме клеток, что позволяет связать молекулярные перестройки в организме этих животных с их физиологическими особенностями, например, с проявлениями артериальной гипертензией и симптоматикой синдрома дефицита внимания с гиперактивностью у детей (СДВГ). В таких условиях могут наблюдаться существенные изменения в кальций-зависимых каскадах передачи внутриклеточного сигнала. Важным компонентом таких каскадов является протеинкиназа С (ПКС) (Lipp, Reither, 2011), которая функционально находится на стыке двух каскадов внутриклеточной сигнализации: рецептор-зависимой активации фосфолипазы С и выброса кальция из внутриклеточных депо (Newton, 2010). Мажорными субстратами этой ПКС являются регуляторные пептиды NAP-22 и MARCKS, которым

принадлежит важнейшая роль в структурных и функциональных процессах клеток, особенно при формировании нейрональных сетей (Mosevitsky, 2005).

В настоящее время не вызывает сомнений, что развитие эссенциальной гипертензии связано с генетически детерминированными нарушениями, а не исключительно с реакцией органов-эффекторов. Эти важнейшие нарушения, происходят преимущественно на клеточной мембране, как это показано на экспериментальных моделях этого заболевания. Дальнейшее исследование молекулярных особенностей у таких животных может дать важнейшие данные для понимания механизмов, участвующих в формировании эссенциальной гипертензии и выявления новых внешних факторов, вовлеченных процесс формирования гипертонической болезни. Получено множество данных (Salvogdenetal., 2008) о существовании генетических нарушениях, участвующих в патогенезе ГБ. Эти изменения носят наследственный характер, поэтому исследование особенностей этих процессов в раннем постнатальном онтогенезе позволит не только углубить наши представления о формирования болезни, но и разработать подходы к ранней диагностике и, возможно, профилактике развития данного заболевания.

Цели и задачи исследования

Цель работы: изучить влияние генетически детерминированных нарушений обмена кальция у крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR) на обмен белков – мажорных субстратов протеинкиназы С.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Оценить влияние на обмен белков NAP-22 и MARCKS в почках в раннем постнатальном онтогенезе уровня поступления экзогенного кальция в организм во время беременности и первых недель жизни.
- 2) Оценить влияние нормального и сниженного потребления кальция на обмен белков NAP-22 и MARCKS в почках взрослых крыс со спонтанной гипертензией.

- 3) Оценить влияние повышенного потребления поваренной соли (солевой нагрузки) на обмен белков NAP-22 и MARCKS в почках у взрослых животных.
- 4) Выявить взаимосвязь между обменом в почках белков NAP-22 и MARCKS, мажорных субстратов протеинкиназы С, в условиях генетически детерминированных нарушений обмена внутриклеточного кальция и дефицита кальция в диете, и выраженностью артериальной гипертензии у половозрелых крыс.
- 5) Оценить перспективность использования белков NAP-22 и MARCKS в качестве маркеров генетически детерминированных нарушений обмена кальция в клетке у крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR).

Научная новизна работы

Впервые исследованы особенности обмена белков NAP-22 и MARCKS в почках, до этого такие белки изучались преимущественно в структурах головного мозга. Впервые проведено сравнение особенностей обмена этих белков в почках у нормотензивных и гипертензивных крыс и обнаружены межлинейные различия в уровне экспрессии мРНК этих регуляторных белков в почках. Впервые продемонстрированы межлинейные различия в уровне синтеза мРНК NAP-22 и MARCKS в почках у животных на разных этапах раннего онтогенеза. Впервые показано, что дефицит экзогенного кальция пролонгирует аномальное повышение уровня мРНК NAP-22 у животных независимо от принадлежности к нормотензивной или гипертензивной линии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У крыс со спонтанной гипертензией генетически детерминированные нарушения обмена кальция в клетке влияют на обмен важнейших регуляторных белков, мажорных субстратов протеинкиназы С, NAP-22 и MARCKS.

2. Недостаточное поступление экзогенного кальция в организм влияет на обмен белков - мажорных субстратов протеинкиназы С в почках крыс со спонтанной гипертензией.
3. Длительное повышенное потребление поваренной соли влияет на обмен белков – мажорных субстратов протеинкиназы С в почках крыс со спонтанной гипертензией.
4. В почках крыс со спонтанной гипертензией имеются послойные различия в уровне синтеза мРНК белков - мажорных субстратов протеинкиназы С.

Теоретическая и практическая значимость работы

Крысы со спонтанной гипертензией являются уникальной экспериментальной моделью ряда заболеваний, таких как артериальная гипертензия и синдром дефицита внимания с гиперактивностью у детей, а также моделью генетически детерминированных нарушений обмена кальция, поэтому особенности молекулярных механизмов, происходящих в их клетках активно изучаются и имеют большое теоретическое значение, а получение новых данных важно для дальнейшего понимания молекулярных механизмов, включенных в каскады передачи внутриклеточного сигнала. Практическое значение состоит в том, что углубление представлений о механизмах патогенеза тяжелых заболеваний позволяют разработать эффективные подходы для их ранней диагностики и возможной профилактики, а также оценки.

Апробация работы

Основные положения и результаты работы были представлены на 9 российских и международных конференциях: Седьмой международной научно-практической конференция «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2014); III Международной виртуальной Интернет-конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее» (Казань, 2014); V Международной

научной Интернет-конференции «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Казань, 2014); Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы физиологии высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем», (Санкт-Петербург, 2015); III Международном конгрессе «Артериальная гипертензия – от Короткова до наших дней» (Санкт-Петербург, 2015); Санкт-петербургском научном форуме 100-летия физиологического общества им. И.П. Павлова Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, 2017); III Всероссийской молодёжной конференции с международным участием «Нейробиология интегративных функций мозга», посвящённая 100-летию Физиологического общества им. И. П. Павлова ФГБНУ «ИЭМ» (Санкт-Петербург, 2017); Всероссийской молодежной конференции с международным участием «Современные аспекты интегративной физиологии» (Санкт-Петербург, 2018); Третьем Национальном конгрессе с международным участием «Здоровые дети — будущее страны» (Санкт-Петербург, 2019).

Публикации

Основное содержание работы отражено в 19 публикациях, из них 5 статей в рецензируемых научных журналах, 3 статьи в академических сборниках и 5 тезисов.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на крысах со спонтанной гипертензией линии SHR, в качестве контроля использовали нормотензивных крыс линии WKY. Всего было задействовано 80 взрослых крыс линии SHR обоего пола массой 175-255г и 80 взрослых крыс линии WKY обоего пола массой 230-280г. Исследования по онтогенезу выполнены на 64 крысятах линии SHR и 64 крысятах линии WKY. Все животные содержались в клетках со свободным доступом к сухому корму производства ЗАО «Гатчинский ККЗ» (рецепт №

ПК-120 сх_149 для лабораторных животных) и воде в условиях 12-часового светового дня. В случае онтогенетических исследований, животные содержались в клетке с матерью в описанных выше условиях.

По окончании каждой серии эксперимента все животные были декапитированы под легким эфирным наркозом с последующим забором почек. Все исследования были проведены в соответствии с Международными стандартами по работе с лабораторными животными, и с разрешения комиссии по биоэтике ФГБУН «Институт физиологии имени И. П. Павлова» РАН. Полученный материал использовали для последующего анализа или хранили при -20°C .

В течение 2-3 минут на льду выделяли сегмент, корковое и мозговое вещество почки по анатомической границе. Полученные образцы почечной ткани использовались для выделения валовой мРНК.

Выделение валовой мРНК и обратная транскрипция. Выделение валовой мРНК осуществлялось с помощью набора Quick-RNA™ MiniPrepKit (ZymoResearch) согласно инструкции производителя. Полученная мРНК хранилась при -20°C и в дальнейшем служила в качестве матрицы для синтеза первой цепи ДНК. Для синтеза использовался «Набор реагентов для проведения обратной транскрипции» (ЗАО «Синтол»). В пробирках смешивались по 1 мкл праймера Random-6 и 10 мкл тотальной мРНК. Далее смесь прогревали при температуре 70°C 5 минут, а затем охлаждали при 10°C 5 минут. К полученному раствору добавляли по 10 мкл 2,5X Реакционной смеси, 1 мкл MMLV-RT и 13 мкл H_2O . Пробирки с полученной смесью инкубировались при температуре 37°C 1 час, после этого пробирки нагревались до 92°C в течение 3 минут. Термостатирование проводилось в амплификаторе АНК-32 (ИАП РАН). Полученную кДНК использовали в реакции ПЦР или хранили при -20°C .

Полимеразная цепная реакция. Уровни экспрессии мРНК NAP-22 и MARCKS определяли методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе АНК-32 (ИАП РАН, Россия) с помощью специфических

праймеров и зондов (Табл. 1). В качестве референса для нормировки результатов амплификации использовали ген β -актина. Условия проведения ПЦР: 1. 95⁰ С 300 с – 1 цикл; 2. 60⁰ С 40 с, 95⁰ С 15 с – 60 циклов. Количественное выражение результатов проводилось с помощью расчета разницы экспрессии исследуемого гена относительно нормировочного гена по формуле $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Таблица 1. Праймеры и зонды для детекции транскриптов генов *NAP-22*, *MARCKS* и β -актина

Ген	Праймеры и зонды	Последовательность (5'- 3')
NAP-22	rNAP22-F2	AACTCCAAGATGGGAGGCAAG
	rNAP22-R2	CAGCCTTCTTGTCTTTGTCCTT
	rNAP-22 probe ROX	(ROX)CTACAATGTGAACGACGAGAAGGCCA(BHQ-2)
MARCKS	MarcksRAT_F58	TCGCTGCGGTCTTGGAGAACT
	MarcksRAT_R58	ACACCAACCCAAGGCTCTTTGTT
	MarcksRAT_PR68	(Cy5)TGCACCCATGCTGGCTTCTTCAACAAAG(BHQ-2)
β -актин	Rat_ACTB_u	AGCCATGTACGTAGCCATCCA
	Rat_ACTB_l	TCTCCGGAGTCCATCACAATG
	Rat_ACTB_Pr_up2	(FAM)TGTCCCTGTATGCCTCTGGTCGTACCAC(RTQ1)

Результаты исследования

1. Влияние пониженного и нормального поступления экзогенного кальция с питьевой водой на уровень экспрессии мРНК *NAP-22* и *MARCKS* в почках крыс линии *SHR* в раннем постнатальном онтогенезе

Исследование проводилось на крысах линий *SHR* и *WKY* обоего пола от рождения до 30 дней. Животные каждой линии были разделены на 2

группы. Первая группа на протяжении трех поколений получала воду с нормальным содержанием Ca^{2+} , соответствующим рекомендованным Всемирной организацией здравоохранения (80 мг/л). Вторая группа получала маломинерализованную воду с содержанием Ca^{2+} 8 мг/л. В третьем поколении в обеих группах отбирались по 4 крысы в возрасте 5, 13, 18 и 30 дней для последующих исследований.

У крыс линии SHR, получавших воду с пониженным содержанием экзогенного кальция, уровень экспрессии мРНК NAP-22 (Рис. 1) изменяется в обоих слоях сходным образом, но в мозговом слое наблюдаются наиболее явные отличия. В возрасте 13 дней в мозговом слое почечной ткани наблюдается резкий рост этого показателя (по сравнению с корковым веществом), а к 30 дню он постепенно снижается. У крыс линии WKY, также, как и у крыс линии SHR этот показатель в обоих слоях изменяется сходным образом, но у всех животных этой линии он существенно ниже, особенно в мозговом веществе. Следует отметить достоверные межлинейные различия в корковом веществе на 18 и 30 дни индивидуального развития, а в мозговом веществе – на 13, 18 и 30 дни.

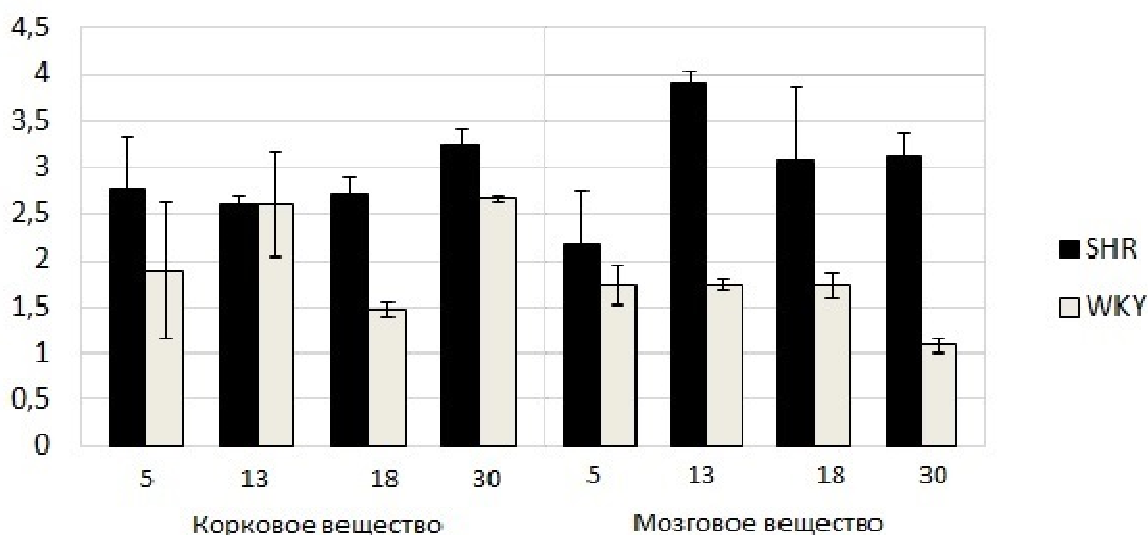


Рис. 1. Уровень экспрессии мРНК NAP-22 в корковом и мозговом слоях почек крыс линий SHR и WKY при сниженном поступлении экзогенного кальция.

Черным цветом обозначены данные, полученные для крыс линии SHR, светло-серым - для крыс линии WKY. Данные представлены в виде средних и

ошибок среднего ($M \pm m$). По оси абсцисс s - возраст животных в днях, по оси ординат - уровень экспрессии в относительных единицах.

В условиях сниженного поступления кальция в организм у крыс со спонтанной гипертензией в корковом слое уровень экспрессии мРНК белка NAP-22 был достоверно выше в возрасте 18 и 30 дней. В мозговом слое такие различия наблюдались в возрасте 13, 18 и 30 дней, еще до формирования у крыс линии SHR устойчивой артериальной гипертензии.

Если недостаток кальция в питьевой воде компенсируется, у таких животных меняется уровень экспрессии мРНК NAP-22 в 13-дневном, 18-дневном и 30 дневном возрасте. У животных, получавших достаточное количество кальция в питьевой воде, уровень экспрессии мРНК NAP-22 (Рис. 2) также изменяется сходным образом в обоих слоях, при этом этот уровень у крыс со спонтанной гипертензией ниже, чем у нормотензивных животных и с возрастом он снижается. В корковом веществе наблюдаются достоверные межлинейные различия на 5 и 30 дни индивидуального развития, а в мозговом веществе – во все дни. У крыс линии SHR уровень экспрессии мРНК NAP-22 в обоих слоях заметно выше, а у крыс линии WKY ниже, чем у крыс, получавших недостаточное количество кальция в питьевой воде.

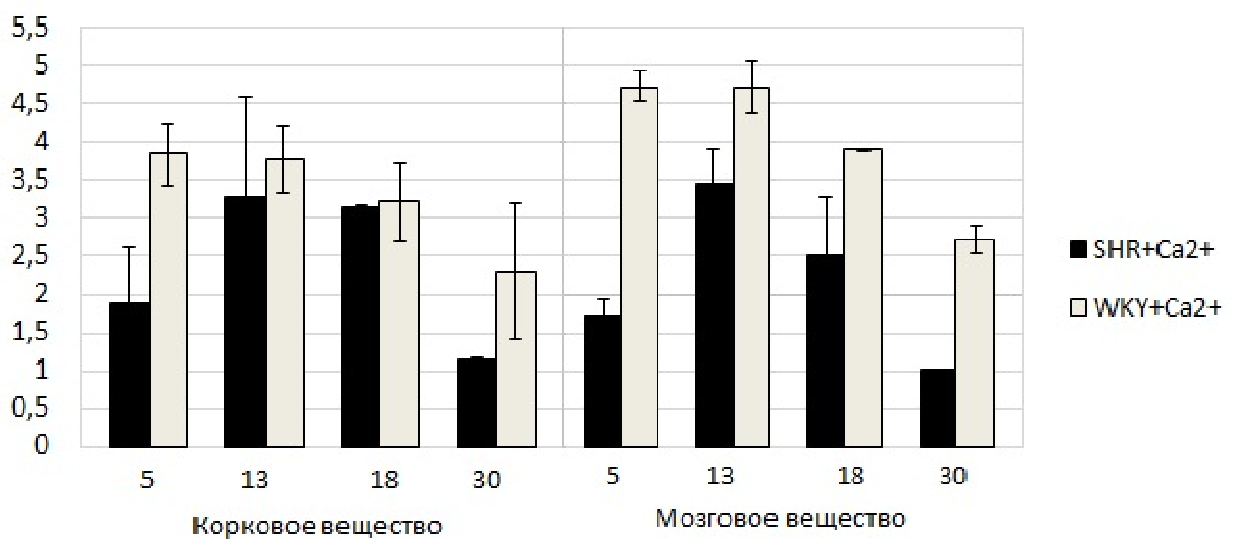


Рис. 2. *Уровень экспрессии мРНК NAP-22 в мозговом и корковом слоях почек крыс линий SHR и WKY при нормальном поступлении экзогенного кальция. Черным цветом обозначены данные, полученные для крыс линии SHR,*

светло-серым - для крыс линии WKY. Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ($M \pm m$). По оси абсцисс - возраст животных в днях, по оси ординат - уровень экспрессии в относительных единицах.

Таким образом, были выявлены межлинейные различия в экспрессии мРНК NAP-22 в структурах почек в онтогенезе, на которые влияет уровень поступления кальция с водой. При поступлении кальция в организм в количествах, рекомендованных ВОЗ (нормальный уровень минерализации питьевой воды), у нормотензивных крыс этот показатель в возрасте до 30 дней был выше, а затем снижался, по сравнению с крысами линии SHR.

Крысы со спонтанной гипертензией демонстрируют существенные отличия в обмене белка MARCKS (Рис. 3) по сравнению с белком NAP-22. У них уровень мРНК соответствующего белка намного ниже, и он монотонно нарастает, начиная с возраста пяти дней до тридцатидневного возраста. У нормотензивного контроля уровень мРНК в возрасте от 5 до 30 дней закономерно не изменяется. У крыс линии SHR после 13 дневного возраста соответствующая мРНК устойчиво обнаруживается в больших количествах как в корковом, так и в мозговом слоях тканей почек. Такой характер обмена белков - основных субстратов ПКС- наблюдается при дефиците экзогенного кальция у самок крыс во время беременности и вскармливания их потомков.

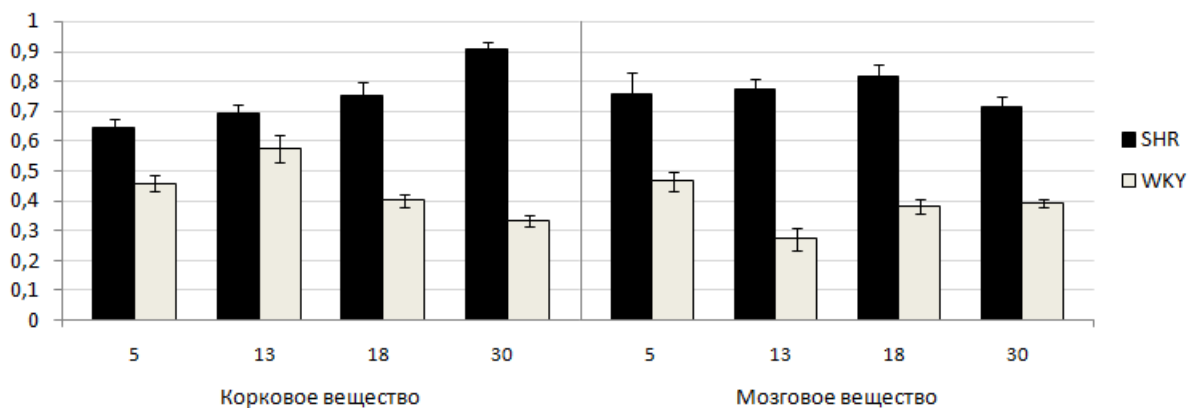


Рис. 3. Уровень экспрессии мРНК MARCKS в корковом и мозговом слоях почек крыс линий SHR и WKY при сниженном поступлении экзогенного кальция. Черным цветом обозначены данные, полученные для крыс линии SHR, светло-серым - для крыс линии WKY. Данные представлены в виде

средних и ошибок среднего ($M \pm m$). По оси абсцисс - возраст животных в днях, по оси ординат - уровень экспрессии у крыс со спонтанной гипертензией в относительных единицах.

При компенсации дефицита экзогенного кальция (Рис. 4), которая, как известно, смягчает проявления генетически детерминированных нарушений обмена кальция в клетке и выраженность спонтанной гипертензии у крыс, уровень экспрессии мРНК MARCKS в почках очень заметно возрастал, а у крыс линии WKY, напротив, снижался. Возможно, усиление обмена белка MARCKS в таких условиях носит компенсаторный характер и является благоприятным фактором, а его снижение – свидетельствует о развитии неблагоприятных процессов, происходящих еще до формирования устойчивого повышения артериального давления и может быть связано не только с гипоперфузией почечных артерий, но и с нарушением молекулярных процессов в каскадах передачи внутриклеточного сигнала в клетках почечной ткани, особенно в подоцитах, обладающих хорошо развитым актиновым цитоскелетом в области фильтрационного аппарата почек, локализованной в корковом слое. Это особенно важно для внутриклеточных каскадов, в которых вторичным мессенджером выступают ионы кальция.

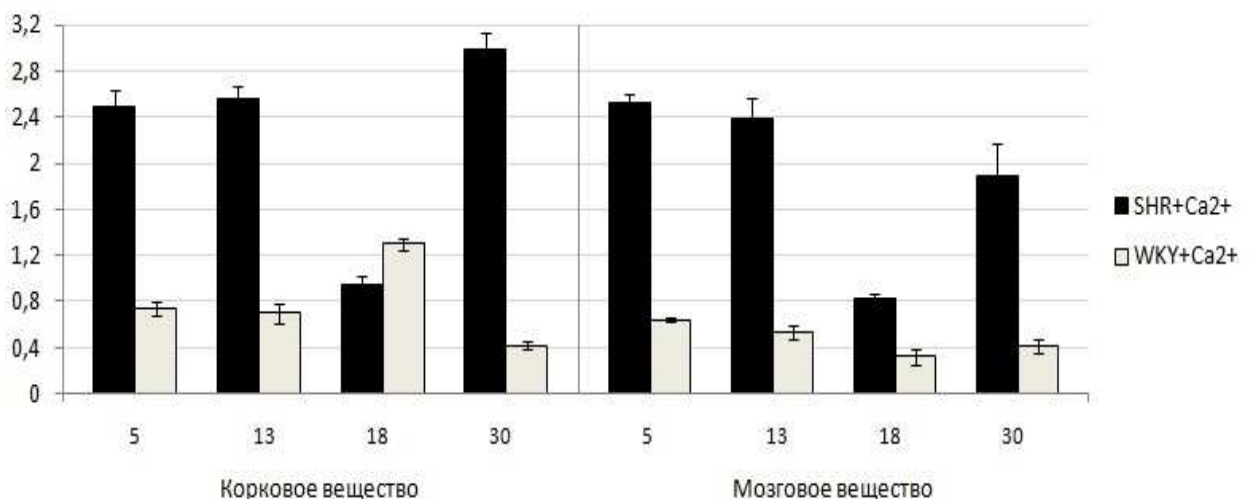


Рис. 4. *Уровень экспрессии мРНК MARCKS в мозговом и корковом слоях почек крыс линий SHR и WKY при нормальном поступлении экзогенного кальция. Черным цветом обозначены данные, полученные для крыс линии SHR, светло-серым - для крыс линии WKY. Данные представлены в виде*

средних и ошибок среднего ($M \pm m$). По оси абсцисс - возраст животных в днях, по оси ординат - уровень экспрессии в относительных единицах.

2. Влияние пониженного и нормального поступления экзогенного кальция с питьевой водой на уровень экспрессии мРНК NAP-22 и MARCKS в почках крыс линии SHR

Исследование проводилось на половозрелых крысах линий SHR и WKY обоего пола. Животные каждой линии были разделены на 2 группы. Первая группа на протяжении двух поколений получала воду с нормальным содержанием Ca^{2+} , соответствующим рекомендованному Всемирной организацией здравоохранения (80 мг/л). Вторая группа получала маломинерализованную воду с содержанием Ca^{2+} 8 мг/л. Во втором поколении в обеих группах отбиралось по 20 крыс в возрасте 90 дней для последующих исследований.

В контрольной группе крыс линий SHR и WKY, получавших воду с пониженным содержанием кальция, были обнаружено неравномерное распределение мРНК NAP-22 в слоях почечной ткани, на фоне достоверных межлинейных различий в уровнях экспрессии мРНК NAP-22 в корковом и мозговом веществе почек. При этом уровень экспрессии мРНК NAP-22 у крыс со спонтанной гипертензией был достоверно ниже, особенно в мозговом слое (Рис. 5).

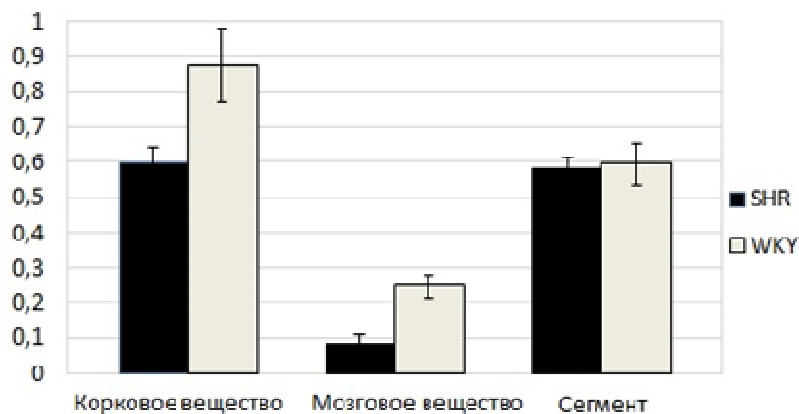


Рис. 5. Уровень экспрессии мРНК NAP-22 (в относительных единицах) в корковом, мозговом веществе и сегменте почек крыс линий SHR и WKY при пониженном поступлении экзогенного кальция (контроль). Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ($M \pm m$).

Как и в раннем постнатальном онтогенезе, на обмен мРНК NAP-22 заметно влияет уровень поступления в организм кальция. При достаточном поступлении кальция с питьевой водой у крыс линии SHR наблюдается достоверный рост уровня экспрессии мРНК NAP-22 в корковом, мозговом веществе и в целом сегменте почек (Рис. 6А).

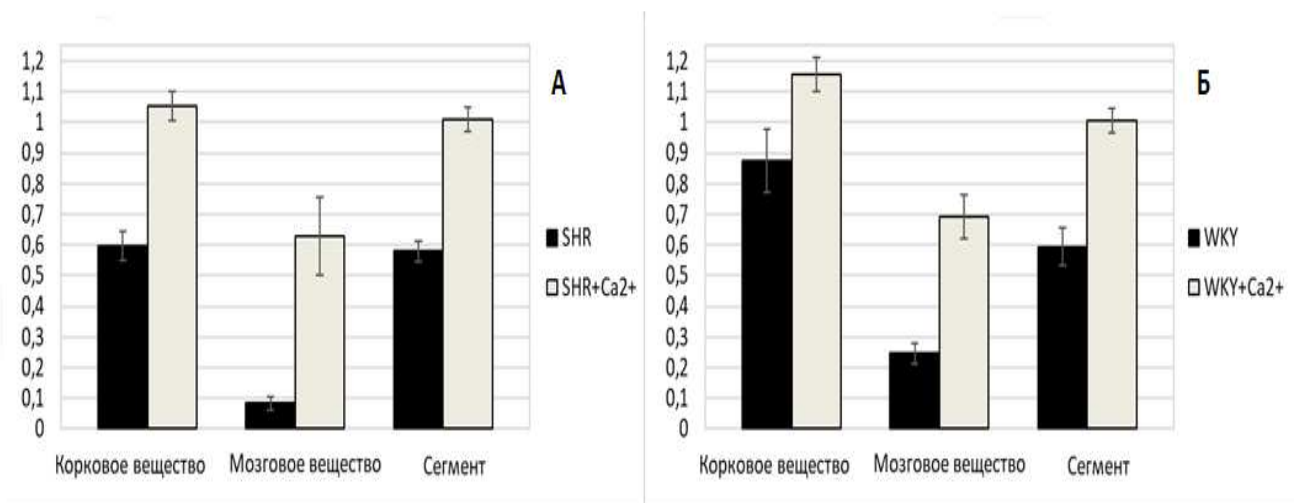


Рис. 6. Уровень экспрессии мРНК NAP-22 (в относительных единицах) в корковом, мозговом веществе и сегменте почек крыс линий SHR(А) и WKY(Б) при пониженном и нормальном поступлении экзогенного кальция. Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ($M \pm m$).

Увеличение поступления кальция в организм у взрослых животных увеличивает экспрессию мРНК NAP-22. Похожая, но менее выраженная реакция наблюдается и у крыс линий WKY. При достаточном поступлении экзогенного кальция у них также наблюдается достоверный рост уровня экспрессии мРНК NAP-22 в корковом, мозговом веществе и сегменте почек, но менее выраженный, чем у крыс линии SHR (Рис. 6Б).

Исходно у крыс линии SHR уровень экспрессии мРНК NAP-22 в корковом и мозговом веществе был достоверно ниже, чем у крыс линии WKY, но при нормализации поступления экзогенного кальция данный

показатель повышался до одинакового уровня в обоих слоях (Рис. 7). Это доказывает, что на особенности обмена белков - мажорных субстратов ПКС у крыс с генетически детерминированными нарушениями обмена кальция в клетке влияет уровень поступления кальция в организм, и особенно неблагоприятно воздействие дефицита кальция в диете проявляется при спонтанной гипертензии, что подтверждает ранее полученные данные.

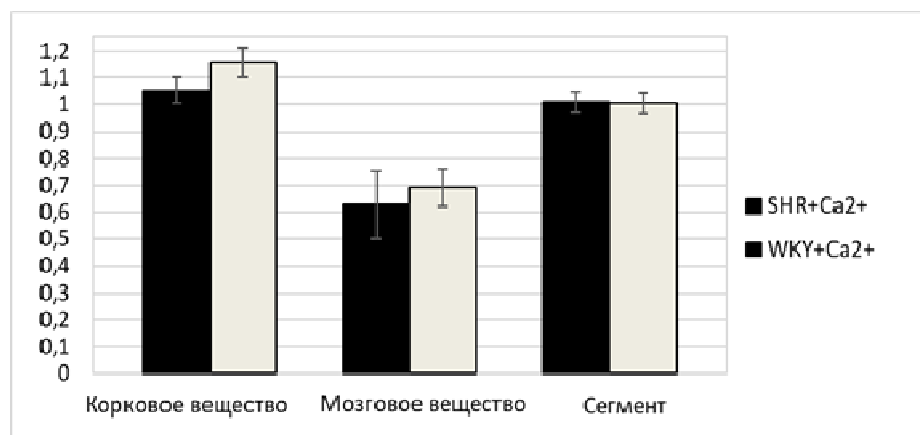


Рис. 7. Уровень экспрессии мРНК NAP-22 (в относительных единицах) в корковом, мозговом веществе и сегменте почек крыс линий SHR и WKY при достаточном поступлении экзогенного кальция. Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ($M \pm m$).

У взрослых животных также наблюдаются выраженные межлинейные различия в интенсивности обмена белка MARCKS (Рис. 8), у крыс линии WKY в обоих слоях почек уровень экспрессии мРНК этого белка выше, чем у крыс со спонтанной гипертензией. Это может свидетельствовать как об его участии в компенсаторных процессах, противодействующих развитию патологии при спонтанной гипертензии (на фоне генетически детерминированных нарушений обмена кальция в клетке), так и о противоположной роли белка NAP-22, на фоне того, что экспрессия мРНК этого белка в клетке, напротив, резко снижается.

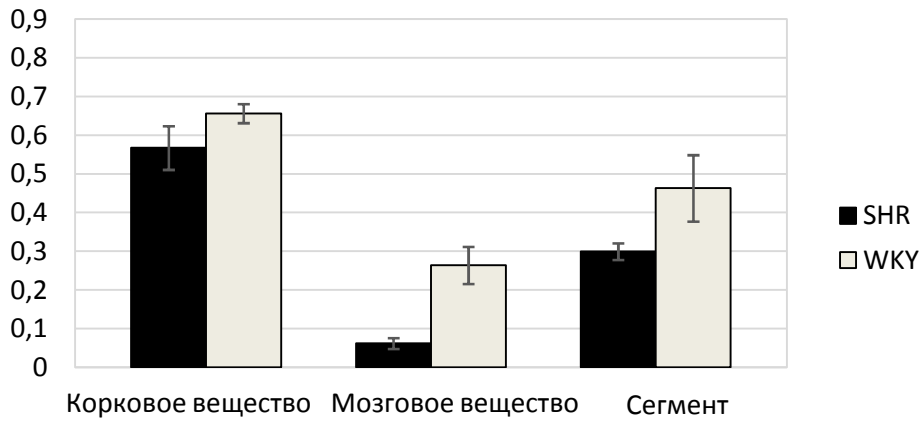


Рис. 8. *Уровень экспрессии мРНК MARCKS (в относительных единицах) в корковом, мозговом веществе и сегменте почек крыс линий SHR и WKY при пониженном поступлении экзогенного кальция (контроль). Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ($M \pm m$).*

Это предположение подтверждается теми изменениями, которые вызывает в обмене белков - мажорных субстратов ПКС компенсация дефицита экзогенного кальция (Рис. 9). Можно считать установленным, что такая компенсация резко улучшает функционирование систем, связанных с транспортом и регуляцией обмена кальция. В этих условиях экспрессия мРНК NAP-22 резко вырастает. Это доказывает то, что при достаточном потреблении кальция в клетке экспрессия мРНК NAP-22 демонстрирует более высокий уровень. Эти изменения отражают более благополучное положение в молекулярных каскадах, обеспечивающих функционирования клеток почек, что подтверждает необходимость достаточного поступления кальция в организм, для предотвращения патологических изменений в почках крыс со спонтанной гипертензией.

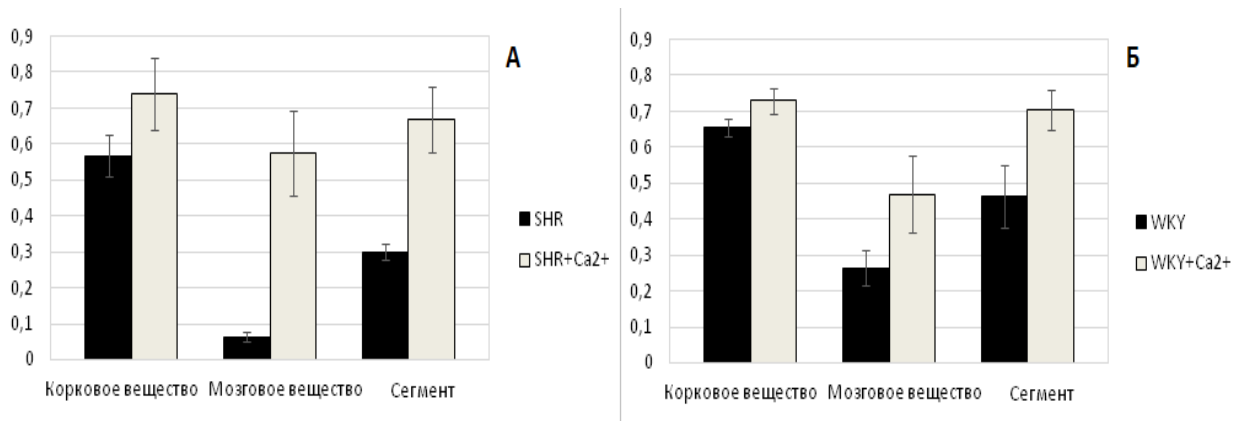


Рис. 9. Уровень экспрессии мРНК MARCKS (в относительных единицах) в корковом, мозговом веществе и сегменте почек крыс линий SHR(A) и WKY(Б) при пониженном и нормальном поступлении экзогенного кальция. Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ($M \pm m$).

3. Влияние повышенного потребления NaCl на уровень экспрессии мРНК NAP-22 и MARCKS в почках крыс линии SHR

Длительное повышенное потребление хлорида натрия является одним из неблагоприятных диетарных факторов, влияющих на развитие артериальной гипертензии (Kotchen et al., 2013). Поэтому было важно оценить особенности обмена белков - мажорных субстратов ПКС в почках, на фоне генетически детерминированных нарушений обмена кальция в клетке и артериальной гипертензии при воздействии солевой нагрузки. Это позволило бы подтвердить связь между этими белками и патогенетическими процессами формирования гипертонической болезни, так как солевая нагрузка - важнейший фактор, отягощающий возникновение и протекание этого заболевания.

Для эксперимента использовалось 20 взрослых самцов крыс линии SHR и 20 взрослых самцов крыс линии WKY в возрасте 90 дней. Крысы каждой линии были поделены на 2 группы, по 20 животных каждая. Животные обеих линий в контрольной группе получали в качестве питьевой воды обычную воду. Животные обеих линий в опытной группе получали в качестве питьевой воды однопроцентный раствор NaCl в течение трех недель.

Регистрация артериального давления у всех животных производилась манжеточным методом до и после эксперимента. Животному в индивидуальной камере на хвост надевали окклюзионную манжетку, соединённую с электроманометром «ЕНЕМА» (Швеция). Уровень артериального давления (АД) соответствовал величине давления в манжетке в момент прекращения пульсовых колебаний. Рассчитывалось среднее значение системного АД по результатам трёх последних измерений (Рис. 10).

У крыс со спонтанной гипертензией солевая нагрузка не изменяла уровня артериального давления (188 ± 3 мм рт.ст. до опыта, 188 ± 8 мм рт.ст. после). У крыс линии WKY солевая нагрузка вызывала рост артериального давления до уровня умеренной гипертензии (до 127 ± 6 мм рт.ст. и после 156 ± 8 мм рт.ст.).

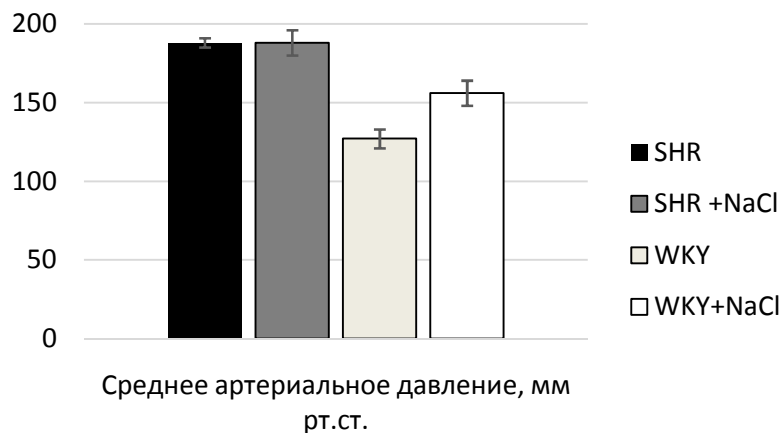


Рис. 10. Среднее артериальное давление до и после солевой нагрузки у гипертензивных и нормотензивных крыс. Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ($M \pm m$).

При солевой нагрузке у крыс линии SHR уровень экспрессии мРНК NAP-22 возрастал в обоих слоях, но наиболее резко в мозговом, а в целом сегменте почки различий обнаружено не было (Рис. 11А).

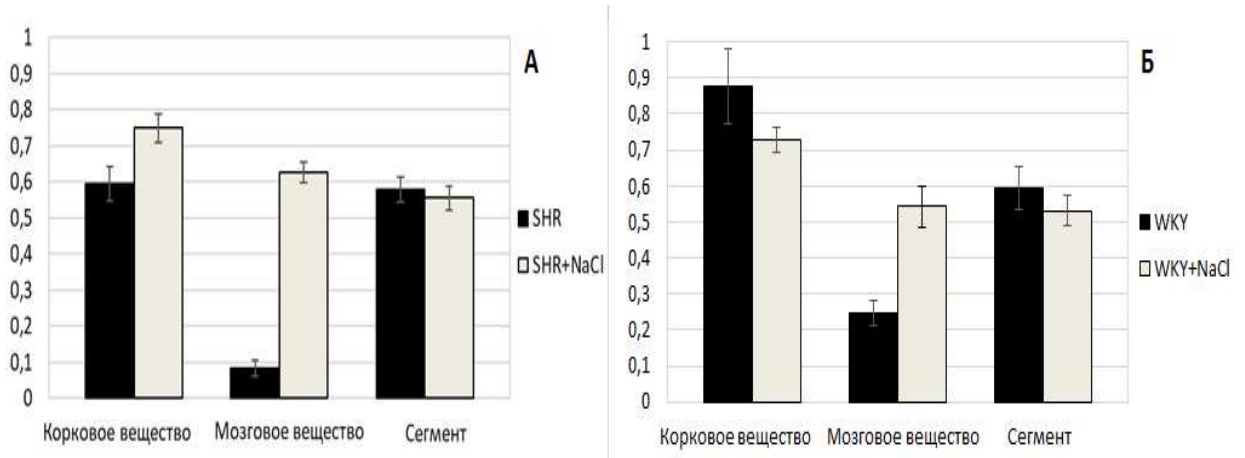


Рис. 11. Уровни экспрессии мРНК NAP-22 (в относительных единицах) в корковом, мозговом веществе и сегменте почек крыс линий SHR (А) и WKY (Б) до и после солевой нагрузки. Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ($M \pm m$).

У крыс линии WKY солевая нагрузка вызывала снижение уровня экспрессии мРНК NAP-22 в корковом веществе и резкий рост в мозговом веществе, а сегменте различий обнаружено не было (Рис. 11Б). Это свидетельствует о возможном исчерпании компенсаторного влияния этого белка у крыс со спонтанной гипертензией и невозможности дальнейшего увеличения его синтеза в почках при сочетании роста концентрации внутриклеточного кальция и увеличения концентрации натрия в плазме крови. И возможно, в цитоплазме почечных клеток.

Уровень мРНК NAP-22 в обоих слоях почек крыс линии SHR исходно был достоверно ниже, чем у крыс WKY (Рис. 12).

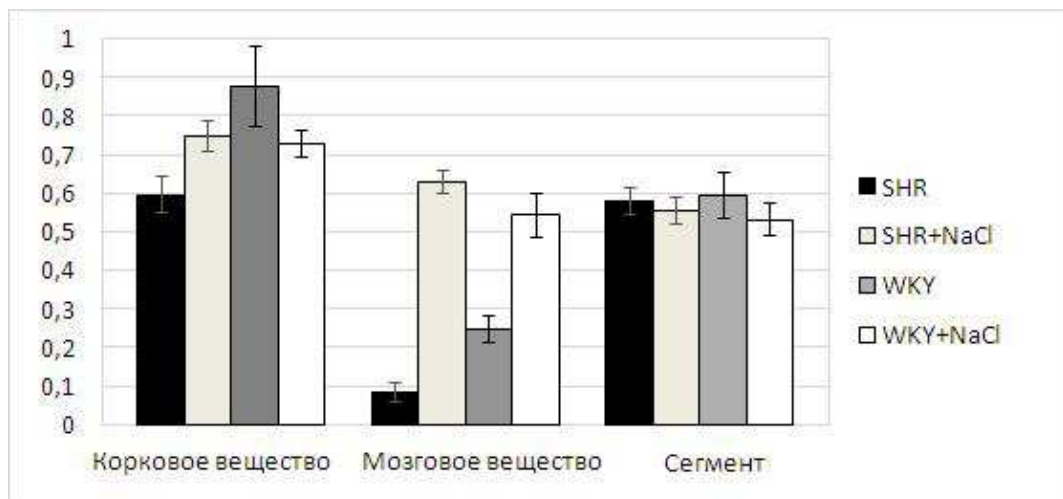


Рис. 12. Уровни экспрессии мРНК NAP-22 (в относительных единицах) в корковом, мозговом веществе и сегменте почек крыс линий SHR и WKY до и после солевой нагрузки. Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ($M \pm m$).

У крыс линии SHR уровень экспрессии мРНК MARCKS и в корковом, и в мозговом слоях существенно ниже (Рис. 13А), чем для белка NAP-22. Однако, воздействие солевой нагрузки увеличивает этот показатель во всех слоях почечной ткани в несколько раз, в отличие от белка NAP-22, экспрессия которого при действии солевой нагрузки, если и увеличивалась, то незначительно.

Важно, что солевая нагрузка изменяла уровень обмена белка MARCKS не только у крыс со спонтанной гипертензией, но и у их нормотензивного контроля и это увеличение также было очень заметным и фиксировалось во всех слоях почечной ткани (Рис. 13Б). Это убедительное доказательство того, что в клетках почек белок MARCKS играет очень важную роль в работе фильтрационного механизма, и участвует в снижении эффектов неблагоприятных факторов, участвующих в патогенезе артериальной болезни, что справедливо как для экспериментальных моделей, так и, вполне вероятно, у пациентов. Скорее всего, появление из-за усиления экспрессии этого белка в цитозоле помогает защитить клетки почек, особенно подоциты, от разрушающих воздействий сочетанной перегрузки кальцием и натрием, развитие которой может привести к апоптозу. Именно этот белок обеспечивает устойчивость актинового цитоскелета в клетках и стабилизирует их форму, что необходимо для нормального протекания сложно организованных процессов в клетках с полярной структурной и функциональной организацией, из которых преимущественно состоит почечная ткань.

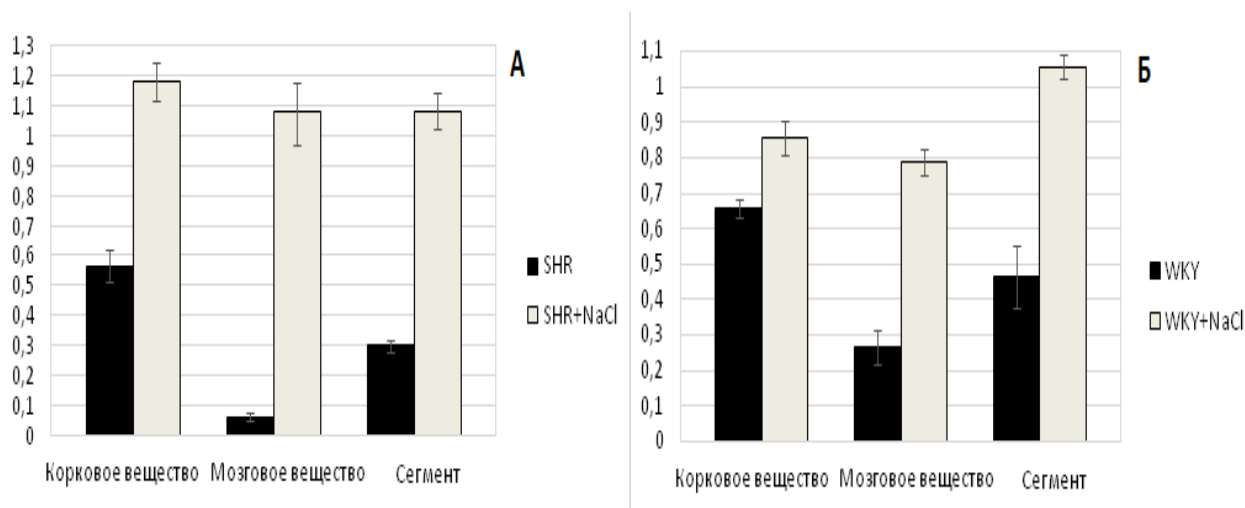


Рис. 13. Уровни экспрессии мРНК MARCKS (в относительных единицах) в корковом, мозговом веществе и сегменте почек крыс линий SHR (А) и WKY (Б) до и после солевой нагрузки. Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ($M \pm m$).

При сопоставлении характеристик обмена белков MARCKS и NAP-22 в клетках почек крыс со спонтанной гипертензией и у их нормотензивного контроля, особенно при воздействии такого специфического для артериальной гипертензии фактора, как повышенное потребление поваренной соли, очевидно, что неблагоприятное воздействие вызывает усиление экспрессии мРНК именно MARCKS, так как, по-видимому, именно этот белок может играть компенсаторную роль и защищает почки в таких неблагоприятных условиях.

Обсуждение

Мы показали, что у крыс со спонтанной гипертензией имеются различия в обмене белков - основных субстратов протеинкиназы С в почках. Также сильно выражены межлинейные различия у крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR) и у крыс линии WKY (их нормотензивного контроля). Важно, что такие межлинейные различия в обмене исследованных белков, проявляются в раннем постнатальном онтогенезе, в возрасте, в

котором у животных еще не регистрируется повышенное артериальное давление.

На обмен исследуемых белков в почках влияют не только генетически детерминированные нарушения клеточного обмена, но и внешние факторы, участвующие в патогенезе артериальной гипертензии у экспериментальных моделей. К таким факторам относятся недостаточное поступление кальция в организм и повышенное потребление поваренной соли. Их воздействие достоверно изменяет уровень обмена белков NAP-22 и MARCKS в почечной ткани исследуемых животных.

Для понимания того, как формируется выявленные нами различия, необходимо рассмотреть механизм функционирования ПКС в клетке, так как исследованные белки являются ее мажорными субстратами.

Фосфорилирование белков - важный регулятор активности клетки. Добавление фосфатной группы может переводить фермент из неактивного состояния в активное. Фосфорилирование - основной механизм при рецептор-зависимом ответе клеток на важнейшие воздействия извне, а аллостерические изменения молекул - это ответ на изменение внутриклеточных условий. Высокая скорость процесса фосфорилирования может дополняться регулированием через быстрое изменение концентрации кальция.

Протеинкиназы катализируют перенос фосфата от АТФ к специфическому (серину, треонину, тирозину) аминокислотному остатку. При гидролизе фосфатидинозитол-4,5-бифосфата фосфолипазой С образуется инозитол-1,4,5-трифосфат и диацилглицерин (DAG). Действие DAG направлено на активацию ПКС. ПКС фосфорилирует целую серию белков по сериновым и треониновым остаткам, и обеспечивает процесс передачи гормонального сигнала от агонистов, повышающих концентрацию кальция в цитозоле. Для активирования ПКС нужны ионы кальция и фосфолипиды (фосфатидилсерин). DAG активирует ПКС, увеличивая ее сродство к кальцию и фосфолипидам.

К белкам, регулируемым путем фосфорилирования, наряду с ферментами, относятся мембранные белки и ферменты, а также белки цитоскелета, структурные и сократительные, в которых при этом фосфорилируются остатки серина, треонина и тирозина. Протеинкиназы оперируют с двумя субстратами, они должны иметь специальный центр связывания АТФ или других нуклеозидфосфатов-доноров остатков фосфора, и центр связывания белка-субстрата, на который осуществляется перенос фосфата. Эти субстратсвязывающие участки располагаются поблизости друг от друга и обладают достаточной специфичностью, то есть протеинкиназы узнают свои субстраты и фосфорилируют определенные белки. (Гусев, 2001; Гринштейн, 2001).

Главная роль ПКС - передача внешних сигналов, связана с метаболизмом инозитолсодержащих фосфолипидов. Передача сигнала включает : рецептор в плазматической мембране с доменом для связывания с первичной сигнальной молекулой, выступающий за пределы клетки; G-белок, передающий сигнал от рецептора на следующие звенья каскада передачи внутриклеточного сигнала; фосфолипазу C, расщепляющую инозитолфосфолипиды. После связывания первичной сигнальной молекулы с рецептором фосфолипаза C воздействует на инозитолфосфатидил 4,5-дифосфат, который расщепляется на диацилглицерил (DAG) и инозитолфосфатидил 1,4,5-трифосфат. DAG активирует ПКС, а инозитол-1,4,5-трифосфат увеличивает вход кальция в цитозоль, активируя кальциевые каналы в мембране эндоплазматического ретикулума.

Исходя из вышесказанного, очевидно, что у крыс со спонтанной гипертензией, для которых доказано наличие генетически детерминированных нарушений в механизмах по поддержанию кальциевого гомеостаза, также имеются нарушения в каскаде внутриклеточного сигнала, связанного с инозитолтрифосфатом. Можно предположить, что в таких условиях изменяется функционирование ПКС и появляются особенности во взаимодействии этого белка с ее мажорными субстратами NAP-22 и

MARCKS. Оба эти белка взаимодействуют с клеточной мембраной миристилированным участком, который погружен в липидный бислой. Эффекторный домен этих белков фосфорилируется ПКС, после чего они могут участвовать в реализации передачи внутриклеточного сигнала взаимодействовать с белками цитоплазмы.

Белок NAP-22 содержит домен, богатый основными и гидрофобными остатками, и располагается очень близко к N-концу. Домен, связывающий кальмодулин, фосфорилируется ПКС. Этот домен можно рассматривать как эффекторный. Фосфорилирование шестого серина ПКС вызывает стехеометрические изменения в структуре NAP-22. Внутри клетки NAP-22 связан с мембраной, его миристилированный фрагмент погружен в липидный бислой, из-за чего не может взаимодействовать с белками цитоплазмы. После взаимодействия с кальмодулином NAP-22 отсоединяется от мембраны. Поскольку связывание кальмодулина или фосфорилирование протеинкиназой С ингибирует связывание NAP-22 с мембраной, его холестерин-связывающая активность регулируется Ca^{2+} (Terashita et al., 2002).

Белок MARCKS при фосфорилировании ПКС или после связывания с кальций-зависимым кальмодулином транслоцируется из мембраны в цитозоль, регулируя динамику актинового цитоскелета и везикулярный транспорт и активируя различные пути передачи сигналов. Как следствие, белок участвует в регуляции клеточной миграции, секреции, пролиферации и дифференциации в различных тканях (Sasaki, 2003), что особенно важно для таких полярно организованных клеток, как подоциты.

Белки NAP-22 и MARCKS активно участвуют в формировании и функционировании актинового цитоскелета. Они взаимодействуют преимущественно с актиновыми микрофиламентами, состоящими из F-актина и связанными с клеточной мембраной. Филаменты участвуют в процессах фагоцитоза, в образовании микровпячиваний и обеспечивают везикулярный транспорт. Полимеризация микрофиламентов, в которой

участвуют белки NAP-22 и MARCKS, легче идет на положительном конце, который расположен ближе к мембране. Вышесказанное приобретает особое значение для клеток, имеющих выраженные отростки. К ним относятся клетки почек, подоциты (Рис. 15), и эпителиальные клетки канальцев. У подоцитов имеются многочисленные отростки, образующие фильтрационные щели. Белки щелевой мембраны обеспечивают регуляторные сигнальные пути фильтрационного барьера через организацию цитоскелета, эндоцитоз и внутриклеточный транспорт в подоцитах. В ножках подоцитов активно образуется фосфоинозитолтрифосфат (PIP₃), который тесно связан с активацией ПКС. Это дополнительно подтверждает возможное участие ПКС и белков, ее мажорных субстратов в работе клеточных элементов почек, особенно на фоне генетически детерминированных изменений обмена кальция в клетке, характерных для крыс со спонтанной гипертензией.

Именно разным уровнем активации ПКС в таких условиях можно объяснить различия в обмене белков NAP-22 и MARCKS у крыс линий SHR и WKY в почках и различное распределение мРНК этих белков в корковом и мозговом слоях почек. В первом преобладают почечные тельца, а во втором эпителиальные структуры, различие функций и развитости цитоскелета вполне объясняют такие различия.

Выводы

1. У крыс со спонтанной гипертензией в почках обмен белка NAP-22, оцениваемый по уровню экспрессии его мРНК, выше, чем у нормотензивных животных, и это различие проявляется сразу после рождения, еще до формирования артериальной гипертензии. Так же выявлены межлинейные различия в обмене белка MARCKS. У животных обеих линий обнаружена неравномерность распределения этих белков в различных слоях почечной ткани.
2. На обмен белков – мажорных субстратов протеинкиназы С в почках крыс со спонтанной гипертензией существенно влияет уровень поступления

экзогенного кальция. Повышение потребления кальция снижает проявление межлинейных различий в обмене белков, компенсируя нарушения обмена кальция в клетке. Дефицит экзогенного кальция, напротив, усиливает эти межлинейные различия.

3. В раннем онтогенезе и у половозрелых животных наблюдается неравномерность обмена белков NAP-22 и MARCKS в структурах почек. У крыс со спонтанной гипертензией эта неравномерность выражена сильнее, чем у нормотензивных животных.

4. На обмен белка MARCKS также сильно влияет еще один фактор патогенеза артериальной гипертензии - солевая нагрузка. Она усиливает экспрессию мРНК MARCKS у крыс обеих линий во всех слоях почечной ткани, в отличие от белка NAP-22, уровень экспрессии мРНК которого в почках крыс обеих линий при действии солевой нагрузки, если и увеличивался, то незначительно.

5. У крыс со спонтанной гипертензией генетически детерминированные нарушения обмена кальция в клетке проявляются в изменении обмена в почках важнейших регуляторных белков, мажорных субстратов ПКС, NAP-22 и MARCKS.

6. Белки NAP-22 и MARCKS, в отличие от других основных субстратов протеинкиназы С, экспрессируются не только в структурах центральной нервной системы, но и в других органах и тканях, что делает их возможными кандидатами на роль маркеров генетически детерминированных нарушений обмена кальция в клетке, характерных для крыс со спонтанной гипертензией, и для части пациентов, страдающих гипертонической болезнью и другими заболеваниями, экспериментальной моделью которых являются крысы линии SHR.

Список работ, опубликованных по теме работы

Статьи:

1. **Альдекеева А.С.**, Корнева Н.А., Руденко Е.Д., Ключева Н.З. Экспрессия мРНК NAR-22 в почках крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR) и нормотензивных крыс (линия WKY) в раннем постнатальном онтогенезе в условиях нормального поступления экзогенного кальция и его дефицита // Артериальная гипертензия. – 2014. – Т. 20. – №. 5. – С. 85-89.
2. **Альдекеева А.С.**, Плеханов А.Ю., Рябикова А.А., Руденко Е.Д., Ключева Н.З. Влияние избыточного потребления хлорида натрия на обмен белка NAR-22 - основного субстрата протеинкиназы-С в структурах головного мозга у крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR) // Журнал НАУ 2016, №1 (17). – С. 145-147.
3. Ключева Н.З., Руденко Е.Д., **Альдекеева А.С.**, Плеханов А.Ю., Чернышев Ю.И., Антонова О.С. Влияние солевой нагрузки на уровень обмена белка NAR 22—мажорного субстрата протеинкиназы С—в гиппокампе и теменной коре крыс со спонтанной гипертензией // Артериальная гипертензия. – 2017. – Т. 23. – №. 4. – С. 325-331.
4. Ключева Н.З., Руденко Е.Д., **Альдекеева А.С.**, Плеханов А.Ю., Корнева Н.А., Петрова Е.И. Влияние повышенного потребления NaCl на уровень обмена белков NAR-22 и MARCKS — мажорных субстратов протеинкиназы С — в почках крыс со спонтанной гипертензией // Артериальная гипертензия. – 2017. – Т. 23. – №. 6. – С. 574-580.
5. **Альдекеева А.С.**, Крайнова Ю.С., Руденко Е.Д., Ключева Н.З. Экспрессия мРНК белков MARCKS и NAR-22 в различных слоях почек крыс со спонтанной гипертензией // Артериальная гипертензия. – 2018. – Т. 24. – №. 4. – С. 435-440.

Тезисы:

1. **Альдекеева А.С.**, Ключева Н. З. Экзогенный кальций влияет на уровень мРНК NAR-22 в теменной коре при различных нагрузках у крыс со спонтанной гипертензией // Сборник статей седьмой международной Научно-практической конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине", Санкт-Петербург. – 2014. – С. 5-7.
2. **Альдекеева А.С.**, Корнева Н.А., Зюбко Т.И. Влияние солевой нагрузки на изменение уровня экспрессии мРНК белка NAR-22 в почках у крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR) // Сборник статей «Биотехнология. Взгляд в будущее», Казань. – 2014. – С. 5-6.
3. **Альдекеева А.С.**, Корнева Н.А., Петрова Е.И., Руденко Е.Д., Чернышев Ю.И., Ключева Н.З. У крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR) при действии солевой нагрузки уровень экспрессии мРНК NAR-22 в теменной

коре зависит от содержания кальция в диете // Сборник статей "Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии", Казань. – 2014. – С. 15-17.

4. Ключева Н.З., Руденко Е.Д., **Альдекеева А.С.**, Плеханов А.Ю., Чернышев Ю.И., Щеголев Б.Ф. Некоторые клеточные механизмы, участвующие в формировании артериальной гипертензии на экспериментальной модели. Сборник тезисов «III Международный конгресс «Артериальная гипертензия – от Короткова до наших дней»», Санкт-Петербург. – 2015 – С. 86-87.

5. **Альдекеева А.С.**, Корнева Н.А. Исследование экспрессии мРНК и посттрансляционных изменений белка NAP-22 в почках при солевой нагрузке у крыс // Современные проблемы физиологии высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем. Материалы всероссийской конференции с международным участием, посвященная 90-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург – Колтуши. – 2015 – С. 11-12.

6. **Альдекеева А.С.** Изменение метаболизма белков – мажорных субстратов протеинкиназы-С (NAP-22, MARCKS) в почках и некоторых отделах ЦНС у крыс со спонтанной гипертензией в условиях повышенного потребления NaCl // Санкт-Петербургский научной форум 100-летия физиологического общества им. И.П. Павлова. Тезисы докладов ,Санкт-Петербург. – 2017. – С. 21-22.

7. **Альдекеева А.С.**, Плеханов А.Ю. Особенности обмена белков MARCKS и NAP-22 в почках крыс со спонтанной гипертензией // Материалы Всероссийской молодежной конференции с международным участием «Современные аспекты интегративной физиологии», Санкт-Петербург. – 2018. – С. 12-13.

8. **Альдекеева А.С.**, Ключева Н.З. Возможные молекулярные механизмы, участвующие в развитии синдрома дефицита внимания с гиперактивностью у детей. Роль генетически детерминированных нарушений обмена кальция в клетке в патогенезе этого синдрома // Сборник трудов третьего национального конгресса с международным участием «Здоровые дети — будущее страны», Санкт-Петербург. – 2019. – С. 48-49.