

ISSN 1607-419X
ISSN 2411-8524 (Online)
УДК 616.12-008.331.1:57.084.1

Уровни экспрессии мРНК NAP-22 и MARCKS в почках крыс со спонтанной гипертензией при потреблении воды с различным содержанием кальция

А. С. Альдекеева¹, А. Ю. Плеханов^{2,3}, Н. З. Клюева⁴

¹ Федеральное бюджетное государственное учреждение науки «Институт аналитического приборостроения Российской академии наук», Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное бюджетное государственное учреждение науки «Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт” — ПИЯФ», Гатчина, Россия

³ Федеральное бюджетное государственное учреждение науки «Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук», Санкт-Петербург, Россия

⁴ Федеральное бюджетное государственное учреждение науки «Институт физиологии имени И. П. Павлова Российской академии наук», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Клюева Наталия Зиновьевна,
ФГБУН «Институт физиологии
им. И. П. Павлова» РАН,
наб. Макарова, д. 6, Санкт-Петербург,
Россия, 199034.
E-mail: natklueva@mail.ru

*Статья поступила в редакцию
28.04.20 и принята к печати 29.04.21.*

Резюме

Цель исследования — оценить влияние уровня потребления кальция с питьевой водой на экспрессию мРНК белков NAP-22 и MARCKS в корковом и мозговом слоях почек крыс со спонтанной гипертензией. **Материалы и методы.** Работа выполнена на самцах крыс линии SHR (n = 8) и самцах крыс линии WKY (n = 8), в возрасте 90 дней. Исследование проводили на образцах ткани из коркового и мозгового слоев почек. Уровни экспрессии мРНК NAP-22 и MARCKS определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени. **Результаты.** Обнаружено, что при достаточном поступлении в организм экзогенного кальция с питьевой водой экспрессия мРНК белков NAP-22 и MARCKS в почках крыс со спонтанной гипертензией находится на уровне, характерном для нормотензивных крыс. При потреблении питьевой воды с недостаточным содержанием кальция этот показатель существенно снижается у обеих линий крыс, причем в большей степени при спонтанной гипертензии, особенно в мозговом веществе. **Заключение.** Генетически детерминированные нарушения обмена кальция в клетках почек крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR) и их влияние на процессы внутриклеточной сигнализации сильнее проявляются при сниженном поступлении экзогенного кальция.

Ключевые слова: SHR, почки, NAP-22, MARCKS, содержание кальция в питьевой воде

Для цитирования: Альдекеева А. С., Плеханов А. Ю., Клюева Н. З. Уровни экспрессии мРНК NAP-22 и MARCKS в почках крыс со спонтанной гипертензией при потреблении воды с различным содержанием кальция. Артериальная гипертензия. 2021;27(4):436–445. doi:10.18705/1607-419X-2021-27-4-436-445

NAP-22 and MARCKS mRNA expression levels in spontaneously hypertensive rat kidneys: the effect of drinking water with different calcium contents

A. S. Aldekeeva¹, A. Y. Plekhanov^{2,3}, N. Z. Klyueva⁴

¹ Institute for Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences, St Petersburg, Russia

² Petersburg Nuclear Physics Institute, Kurchatov Centre, Gatchina, Russia

³ Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St Petersburg, Russia

⁴ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St Petersburg, Russia

Corresponding author:

Natalya Z. Klyueva,
Pavlov Institute of Physiology,
6 Makarova embankment, St Petersburg,
199034 Russia.
E-mail: natklyueva@mail.ru

Received 28 April 2020;
accepted 29 April 2021.

Abstract

Objective. The aim of study was to assess the effect of the level of calcium intake with drinking water on NAP-22 and MARCKS mRNA expression in cortical and medullar kidney layers of spontaneously hypertensive rats. **Design and methods.** The study involved 90-day-old SHR (n = 8) and WKY (n = 8) strain rats of both sexes. We assessed tissue samples from cortical and medullar kidney layers. NAP-22 and MARCKS mRNA expression levels were determined by RT-PCR. **Results.** Sufficient drinking water calcium intake was associated with similar the expression of NAP-22 and MARCKS mRNA in kidneys of spontaneously hypertensive and normotensive rats. Consumption of drinking water with insufficient calcium content it decreases in both rat strains, being more evident in spontaneously hypertensive rats, especially in the medullar layer. **Conclusions.** Our results show that genetically determined impairments of calcium metabolism in cells of spontaneously-hypertensive rats (SHR line) and their effect on intracellular signaling processes are more evident with the reduced intake of exogenous calcium.

Key words: SHR, kidney, NAP-22, MARCKS, calcium content in drinking water

For citation: Aldekeeva AS, Plekhanov AY, Klyueva NZ. NAP-22 and MARCKS mRNA expression levels in spontaneously hypertensive rat kidneys: the effect of drinking water with different calcium contents. Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension. 2021;27(4):436–445. doi:10.18705/1607-419X-2021-27-4-436-445

Введение

В предыдущих исследованиях нами были обнаружены различия в уровнях экспрессии мРНК белков — основных субстратов протеинкиназы С (ПКС) MARCKS (myristoylated alanine-rich C-kinase substrate) и NAP-22 (neuronal axonal membrane protein-22) в корковом и мозговом слоях почек как у крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR), так и у их нормотензивного контроля (линия WKY) [1].

Такие различия могут быть связаны с характерными для крыс со спонтанной гипертензией генетически детерминированными нарушениями обмена кальция в клетке [2], приводящими к повышению

уровня несвязанного кальция в цитозоле [3]. Так как функционирование ПКС и ее основных субстратов тесно связано с функционированием кальциевых каскадов внутриклеточной сигнализации в клетке, особый интерес представляет изучение их обмена в клетках крыс линии SHR.

В патогенезе артериальной гипертензии, в том числе у крыс линии SHR, важная роль отводится почкам. Так, утверждается [4], что выраженность гипертензивных повреждений в почках крыс линии SHR зависит от давления. При этом первоначальные повреждения сосудов ведут к потере авторегуляции и гипертрофии артерий в юкстамедуллярной коре,

остальные структуры коркового слоя относительно защищены. Согласно цитируемой работе, прогрессирующая гипертрофия артериол вызывает гломерулярный коллапс, что в дальнейшем приводит к атрофии трубочек.

Однако в более поздних исследованиях [5] было показано, что у крыс линии SHR повреждения в почках развиваются медленнее, чем полагали ранее, и что у них, в отличие от крыс линии Stroke-Prone, гломерулярные капилляры частично защищены сохранившейся почечной сосудистой авторегуляцией.

Таким образом, в соответствии с последними исследованиями [6], крысы линии SHR в большей степени являются экспериментальной моделью легкой или средней степени тяжести артериальной гипертензии у людей, при которой риск гипертензивного нефросклероза невысок, а повреждения в почках развиваются преимущественно в прекапиллярных кровеносных сосудах и интерстиции.

Ранее было показано, что на формирование артериальной гипертензии у крыс линии SHR также оказывает влияние количество кальция, поступающего с водой и пищей [7].

В связи с этим особый интерес представляет изучение экспрессии мРНК белков MARCKS и NAP-22 [8–11], которая отражает особенности внутриклеточной сигнализации на фоне генетически детерминированных нарушений обмена кальция в клетке, характерных для крыс линии SHR. Также важно исследовать влияние на эти процессы нормализованного и сниженного потребления кальция.

Цель исследования — оценить влияние уровня потребления кальция с питьевой водой на экспрессию мРНК белков NAP-22 и MARCKS в корковом и мозговом слоях почек крыс со спонтанной гипертензией.

Материалы и методы

В исследованиях использовали крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR) и крыс линии

WKY в качестве нормотензивного контроля. Крысы содержались группами в клетках со свободным доступом к корму (комбикорм ЛБК-120 для лабораторных животных ЗАО «Тосненский комбикормовый завод», с содержанием кальция 0,48–0,76%) и воде в условиях 12-часового светового дня. Животные каждой линии были разделены на 2 группы. Первая группа (SHR+Ca и WKY+Ca) на протяжении двух поколений получала воду с содержанием Ca²⁺, соответствующим рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (80 мг/л). Для этого к водопроводной воде добавляли CaCl₂ до искомой конечной концентрации. Вторая группа (SHR-Ca и WKY-Ca) получала маломинерализованную водопроводную воду Санкт-Петербургского водоканала с содержанием Ca²⁺ 8 мг/л.

Во втором поколении из каждой группы случайным образом отбиралось по 8 самцов в возрасте 90 дней для последующих исследований. К этому возрасту у крыс стабилизируется масса тела, а у крыс линии SHR формируется устойчивая гипертензия с систолическим артериальным давлением (АД) более 170 мм рт. ст., но еще не выявляются специфические морфологические изменения в сердечно-сосудистой системе [12].

Систолическое АД измеряли у каждой крысы с помощью окклюзионной манжетки и электронометра ELEMA трижды непосредственно перед опытом и учитывали среднее (медианное) значение. В группе SHR при потреблении воды с различным содержанием кальция АД изменялось незначительно и составляло (среднее ± ошибка среднего) 181,2 ± 1,1 мм рт. ст. при нормальном потреблении кальция против 184,6 ± 1,3 мм рт. ст. при дефиците кальция (табл. 1). В группе WKY при пониженном потреблении кальция АД значительно повышалось (136,0 ± 1,7 против 123,2 ± 0,8 мм рт. ст., p = 0,00002), что в целом соответствует опубликованным данным [13]. Различия в значениях АД при недостатке кальция в питьевой воде в цитируемой работе, по сравнению с нашими наблюдениями, может быть обусловлено

Таблица 1

АРТЕРИАЛЬНОЕ ДАВЛЕНИЕ У КРЫС ЛИНИЙ SHR И WKY

Линия	Кальций	Среднее значение АД (мм рт. ст.) с 95 % ДИ	Разность средних	p-значение
SHR	–	181 ¹⁸⁴ ₁₈₇	-0,7 ³ _{6,7}	0,10
	+	178 ¹⁸¹ ₁₈₄		
WKY	–	132 ¹³⁶ ₁₄₀	8,7 ¹³ _{16,8}	0,00002*
	+	121 ¹²³ ₁₂₅		

Примечание: АД — артериальное давление; ДИ — доверительный интервал.

ПРАЙМЕРЫ, ЗОНДЫ И ПРОДУКТЫ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Ген	Праймеры и зонды	Последовательность (5'-3')
NAP-22	rNAP22-F2	AACTCCAAGATGGGAGGCAAG
	rNAP22-R2	CAGCCTTCTTGTCTTTGTCTT
	rNAP-22 probe ROX	(ROX)CTACAATGTGAACGACGAGAAGGCCA(BHQ-2)
	Длина продукта ПЦР	88 п.н.
MARCKS	MarcksRAT_F58	TCGCTGCGGTCTTGGAGAACT
	MarcksRAT_R58	ACACCAACCCAAGGCTCTTTGTT
	MarcksRAT_PR68	(Cy5)TGCACCCATGCTGGCTTCTTCAACAAAG(BHQ-2)
	Длина продукта ПЦР	97 п.н.
β-актин	Rat_ACTB_u	AGCCATGTACGTAGCCATCCA
	Rat_ACTB_l	TCTCCGGAGTCCATCACAATG
	Rat_ACTB_Pr_up2	(FAM)TGTCCTGTATGCCTCTGGTCGTACCAC(RTQ1)
	Длина продукта ПЦР	81 п.н.

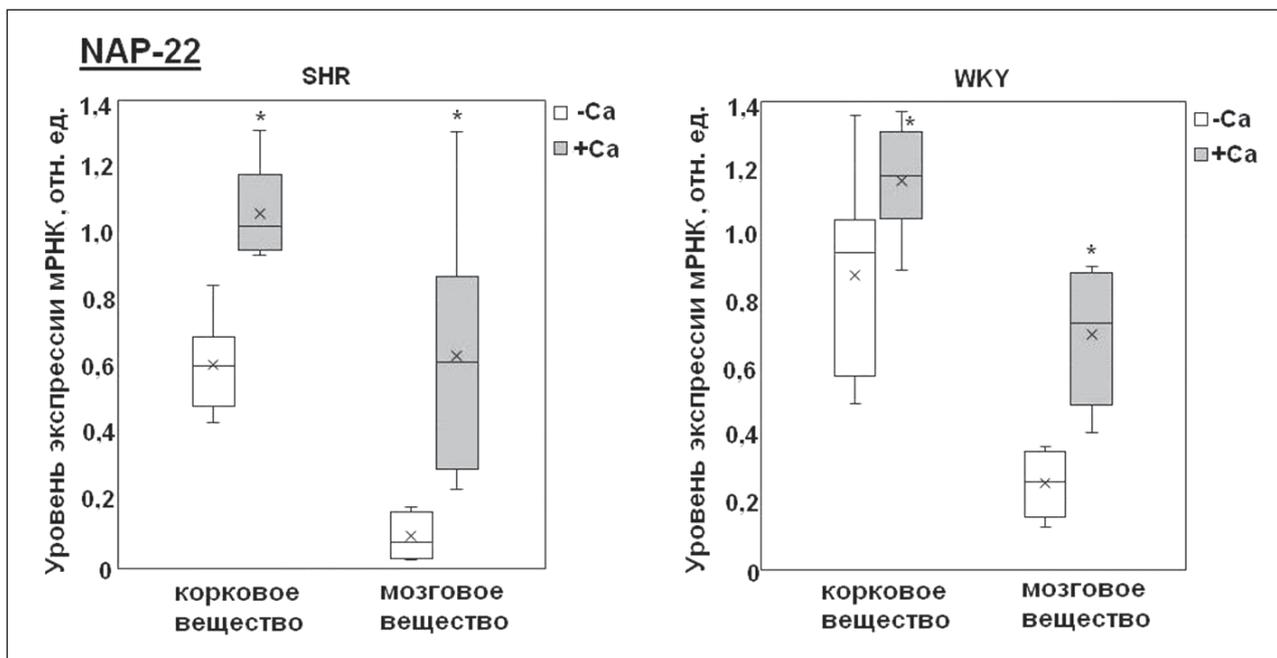
Примечание: ПЦР — полимеразная цепная реакция.

составом корма, в частности, уровнем содержания в нем несвязанного кальция [7].

Для определения уровней экспрессии мРНК белков NAP-22 и MARCKS животные были декапитированы под легким эфирным наркозом с последующим забором образцов ткани почек из коркового и мозгового слоев. Из полученных образцов ткани крыс обеих линий была выделена валовая мРНК с помощью набора Quick-RNA™ MiniPrepKit (ZymoResearch, США) согласно инструкции произ-

водителя. Далее был осуществлен синтез комплементарной ДНК с помощью набора реагентов «ОТ-1» для обратной транскрипции (СИНТОЛ, Россия). Уровни экспрессии мРНК NAP-22 и MARCKS определяли методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в реальном времени (ОТ-ПЦР) с реакционной смесью «ПЦР-микс» (СИНТОЛ, Россия) на амплификаторе АНК-32 (ФГБУН «Институт аналитического приборостроения РАН», Россия). В качестве референ-

Рисунок 1. Уровень экспрессии мРНК NAP-22 (в относительных единицах) в корковом и мозговом веществе почек крыс линий SHR и WKY при пониженном (-Ca) и нормальном (+Ca) поступлении экзогенного кальция



Примечание: Крестик внутри каждого прямоугольника — среднее по выборке. Горизонтальная линия несколько выше или ниже крестика — медиана. Верхняя и нижняя границы прямоугольника — 1-й и 3-й квартили. Горизонтальные линии на концах «усов» — наибольшее и наименьшее значения в выборке. Звездочкой указаны значимые различия при различном потреблении кальция (табл. 3).

РАЗЛИЧИЯ В ЭКСПРЕССИИ мРНК NAP-22 И MARCKS В СТРУКТУРАХ ПОЧЕК ПРИ РАЗЛИЧНОМ ПОСТУПЛЕНИИ КАЛЬЦИЯ С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ

Маркер	Линия	Структура	Кальций	Среднее значение (отн. ед.) с 95 % ДИ	Разность средних с 95 % ДИ	р-значение
NAP-22	SHR	KB	+	1,05 _{0,94} ^{1,16}	0,45 _{0,31} ^{0,59}	0,00016*
			–	0,60 _{0,49} ^{0,71}		
		MB	+	0,63 _{0,33} ^{0,93}	0,55 _{0,27} ^{0,82}	
			–	0,08 _{0,03} ^{0,14}		
	WKY	KB	+	1,16 _{1,03} ^{1,29}	0,28 _{0,03} ^{0,53}	0,028*
			–	0,88 _{0,64} ^{1,12}		
		MB	+	0,69 _{0,52} ^{0,86}	0,44 _{0,28} ^{0,62}	0,00016*
			–	0,25 _{0,17} ^{0,33}		
MARCKS	SHR	KB	+	0,87 _{0,64} ^{1,10}	0,23 _{-0,06} ^{0,51}	0,074
			–	0,64 _{0,43} ^{0,85}		
		MB	+	0,57 _{0,29} ^{0,85}	0,45 _{0,19} ^{0,72}	
			–	0,12 _{0,03} ^{0,21}		
	WKY	KB	+	0,73 _{0,64} ^{0,82}	0,07 _{-0,02} ^{0,17}	0,16
			–	0,66 _{0,60} ^{0,72}		
		MB	+	0,47 _{0,22} ^{0,72}	0,15 _{-0,13} ^{0,42}	0,19
			–	0,32 _{0,15} ^{0,49}		

Примечание: ДИ — доверительный интервал; KB — корковое вещество; MB — мозговое вещество. Статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) отмечены звездочкой (*).

са для нормирования результатов амплификации использовали ген β -актина. Поскольку опытную и нормировочную кДНК амплифицировали совместно («в одной пробирке»), а результат выражали в относительных единицах опыт/референс, необходимости в нормировании количества кДНК перед осуществлением ПЦР не было. Праймеры и зонды для генов NAP-22, MARCKS и β -актина были синтезированы компанией СИНТОЛ (Россия) (табл. 2). Условия проведения ПЦР: 1. 95 °C 300 с — 1 цикл; 2. 60 °C 40 с, 95 °C 15 с — 50 циклов. Уровень экспрессии исследуемого гена рассчитывался относительно нормировочного гена по формуле $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Работа выполнена с использованием животных из биобанка ФГБУН «Институт физиологии им. И. П. Павлова» РАН 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.

Статистическую обработку проводили с помощью программного обеспечения, представленного в открытом доступе на сайтах statskingdom.com и graphpad.com (последнее — для вычисления разности средних и доверительного интервала: graphpad.com/quickcalcs/ttest1/? Format=SD). Различия между выборками оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Различия полагали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. (При незначительном превышении выбранного уровня значимости и, если при этом распределение в обеих выборках было близко к нормальному в тесте Шапиро–Уилка, различия в выборках дополнительно оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.)

Результаты

На рисунке 1 представлены экспериментальные данные об экспрессии мРНК NAP-22. Дефицит потребления кальция с питьевой водой приводит к снижению экспрессии мРНК NAP-22 во всех ис-

РАЗЛИЧИЯ В ЭКСПРЕССИИ мРНК NAP-22 И MARCKS
МЕЖДУ КОРКОВЫМ И МОЗГОВЫМ СЛОЯМИ ПОЧЕК

Маркер	Кальций	Линия	Структура	Среднее значение (отн. ед.) с 95 % ДИ	Разность средних с 95 % ДИ	p-значение
NAP-22	+	SHR	KB	$0,94^{1,05}_{1,16}$	$0,13^{0,42}_{0,72}$	0,012*
			MB	$3,33^{0,63}_{0,93}$		
		WKY	KB	$1,03^{1,16}_{1,29}$	$0,27^{0,47}_{0,66}$	
			MB	$0,52^{0,69}_{0,86}$		
	-	SHR	KB	$0,49^{0,60}_{0,71}$	$0,40^{0,52}_{0,62}$	0,00016*
			MB	$0,03^{0,08}_{0,14}$		
		WKY	KB	$0,64^{0,88}_{1,12}$	$0,39^{0,63}_{0,86}$	
			MB	$0,17^{0,25}_{0,33}$		
MARCKS	+	SHR	KB	$0,64^{0,87}_{1,10}$	$-0,03^{0,30}_{0,63}$	0,050*
			MB	$0,29^{0,57}_{0,85}$		
		WKY	KB	$0,64^{0,73}_{0,82}$	$0,02^{0,26}_{0,50}$	
			MB	$0,22^{0,47}_{0,72}$		
	-	SHR	KB	$0,43^{0,64}_{0,85}$	$0,31^{0,52}_{0,73}$	0,00016*
			MB	$0,03^{0,12}_{0,21}$		
		WKY	KB	$0,60^{0,66}_{0,72}$	$0,18^{0,34}_{0,50}$	
			MB	$0,15^{0,32}_{0,49}$		

Примечание: ДИ — доверительный интервал; KB — корковое вещество; MB — мозговое вещество. Статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) отмечены звездочкой (*).

следованных структурах почки как у спонтанно-гипертензивных крыс линии SHR, так и в нормотензивном контроле (линия WKY) (табл. 3).

Межструктурные различия (табл. 4). При дефиците кальция корковое вещество почек экспрессирует значимо больше мРНК NAP-22 по сравнению с мозговым веществом. При нормальном потреблении кальция эти различия также остаются значимыми.

Межлинейные различия (табл. 5). В структурах почек у спонтанно-гипертензивных крыс при дефиците кальция экспрессия мРНК NAP-22 в целом ниже, чем в соответствующих структурах у контрольных нормотензивных крыс линии WKY. Отмеченные межлинейные различия становятся незначимыми при нормальном потреблении кальция с питьевой водой.

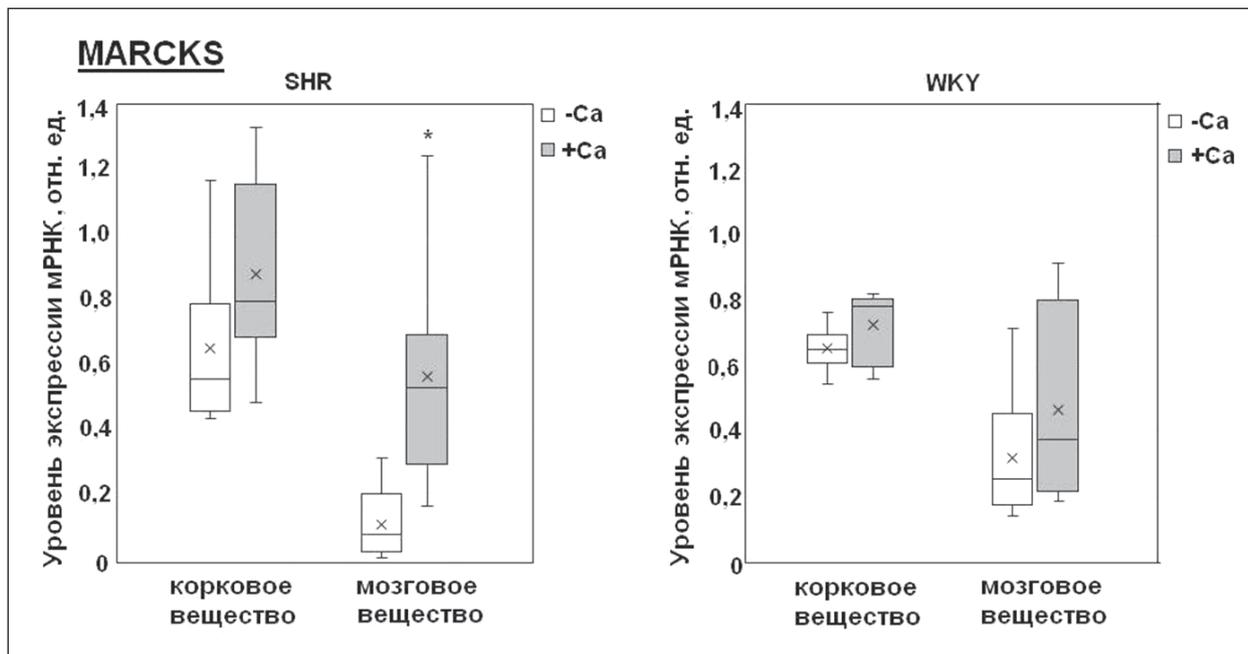
На рисунке 2 представлены экспериментальные данные об экспрессии мРНК MARCKS. При дефиците потребления кальция с питьевой водой экспрессия мРНК MARCKS в почках спонтанно-

гипертензивных крыс линии SHR обнаруживает тенденцию к понижению. Значимое снижение экспрессии отмечено для мозгового вещества. Уровень значимости $p = 0,074$, полученный для коркового вещества, при увеличении выборки может оказаться менее 0,05, следовательно, и в этой структуре есть основание предполагать ту же тенденцию (табл. 3).

Межструктурные различия (табл. 4). При дефиците кальция корковое вещество почек экспрессирует значимо больше мРНК MARCKS по сравнению с мозговым веществом. Восполнение дефицита кальция сглаживает межструктурные различия до пограничного значения выбранного уровня значимости (линия SHR, $p = 0,05$) или до незначимого уровня (линия WKY).

Межлинейные различия в экспрессии мРНК MARCKS при дефиците кальция обнаруживаются только в корковом слое почек ($p = 0,018$), однако и эти различия нивелируются при восполнении недостатка кальция в питьевой воде (табл. 5).

Рисунок 2. Уровень экспрессии мРНК MARCKS (в относительных единицах) в корковом и мозговом веществе крыс линий SHR и WKY при пониженном (-Ca) и нормальном (+Ca) поступлении экзогенного кальция



Примечание: Крестик внутри каждого прямоугольника — среднее по выборке. Горизонтальная линия несколько выше или ниже крестика — медиана. Верхняя и нижняя границы прямоугольника — 1-й и 3-й квартили. Горизонтальные линии на концах «усов» — наибольшее и наименьшее значения в выборке. Звездочкой указаны значимые различия при различном потреблении кальция (табл. 3).

Обсуждение

С молекулярной точки зрения NAP-22 и MARCKS — это белки со сходной структурой, содержащие один и тот же набор функциональных доменов и различающиеся молекулярной массой (22 кДа у NAP-22 против 80 кДа у MARCKS) и количеством актинсвязывающих областей (одна у NAP-22 и две у MARCKS) [8]. Их универсальные функции, осуществляемые практически во всем организме под контролем ПКС, сводятся к регуляции высвобождения полифосфоинозитидов из клеточной мембраны в цитоплазму [8], регуляции концентрации кальмодулина [8–10] и модификации актинового цитоскелета [8, 11]. В этом отношении изучаемые белки, а также MAL («легкий» MARCKS) представляются функционально аналогичными. И наши данные подтверждают этот тезис.

В частности, эпителиальные натриевые каналы в восходящей части петли Генле, с повышенной активностью которых связывают повышенное АД, положительно регулируются дифосфоинозитидами. Показано, что «легкий» MARCKS понижает активность этих каналов [14]. При этом солевая нагрузка снижает экспрессию этого белка, что делает молекулы дифосфоинозитидов более доступными для активации эпителиальных натриевых каналов. Таково одно из возможных объяснений известного явления повышения АД при солевой нагрузке.

Описанные результаты согласуются с нашими данными по NAP-22 и MARCKS. В самом деле, факторы, способствующие повышению АД, такие как солевая нагрузка [15] и пониженное поступление кальция с питьевой водой (табл. 3), понижают экспрессию мРНК NAP-22 и отчасти MARCKS, аналогично MAL в цитируемой публикации. Любопытно, что, по нашим данным (табл. 3), снижение экспрессии MARCKS (ближайшего аналога MAL) при воздействии фактора, способствующего повышению АД, наблюдалось только в мозговом веществе почек, где расположены именно петли Генле.

С другой стороны, из представленных здесь данных можно сделать вывод о большей вовлеченности NAP-22 (по сравнению с MARCKS) в патологические процессы, происходящие в почках взрослых крыс при недостаточном потреблении кальция. Как мы здесь показываем, у взрослых крыс со спонтанной гипертензией и в нормотензивном контроле при дефиците поступления кальция с питьевой водой наблюдалось снижение уровня экспрессии мРНК NAP-22. В значительно меньшей степени это относится к MARCKS (наблюдается только в мозговом веществе крыс линии SHR, табл. 3).

Итак, длительное потребление воды с дефицитом кальция даже у нормотензивных крыс может приводить к повышению АД (табл. 3, [13]) и, как мы здесь видим, к снижению экспрессии изучаемого

МЕЖЛИНЕЙНЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ЭКСПРЕССИИ мРНК NAP-22 И MARCKS

Маркер	Кальций	Структура	Линия	Среднее значение (отн. ед.) с 95 % ДИ	Разность средних с 95 % ДИ	p-значение
NAP-22	+	KB	WKY	$1,16_{1,03}^{1,29}$	$0,11_{-0,05}^{0,27}$	0,16
			SHR	$1,05_{0,94}^{1,16}$		
		MB	WKY	$0,69_{0,52}^{0,86}$	$0,06_{-0,25}^{0,37}$	0,65
			SHR	$0,63_{0,33}^{0,93}$		
	-	KB	WKY	$0,88_{0,64}^{1,12}$	$0,28_{0,04}^{0,52}$	0,065* ¹⁾
			SHR	$0,60_{0,49}^{0,71}$		
MB		WKY	$0,25_{0,17}^{0,33}$	$0,17_{0,08}^{0,26}$	0,0047*	
		SHR	$0,08_{0,03}^{0,14}$			
MARCKS	+	KB	WKY	$0,73_{0,64}^{0,82}$	$-0,14_{-0,37}^{0,09}$	0,6
			SHR	$0,87_{0,64}^{1,10}$		
		MB	WKY	$0,47_{0,22}^{0,72}$	$-0,10_{-0,44}^{0,24}$	0,57
			SHR	$0,57_{0,29}^{0,85}$		
	-	KB	WKY	$0,66_{0,60}^{0,72}$	$0,02_{-0,18}^{0,22}$	0,49
			SHR	$0,64_{0,43}^{0,85}$		
		MB	WKY	$0,32_{0,15}^{0,49}$	$0,20_{0,03}^{0,37}$	0,018*
			SHR	$0,12_{0,03}^{0,21}$		

Примечание: ДИ — доверительный интервал; KB — корковое вещество; MB — мозговое вещество; ¹⁾ — 0,028 по Стьюденту (в сравниваемых выборках распределение значений близко к нормальному: $W_1 = 0,9$; $W_2 = 0,7$). Статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) отмечены звездочкой (*).

мых белков. Вполне закономерно предположить, что NAP-22, подобно MAL [14] (и, вероятно, по тому же механизму), участвует в регуляции АД у взрослых крыс. Дополнительное исследование, позволяющее провести корреляционный анализ зависимости АД от экспрессии NAP-22, вероятно, поможет высказать более уверенное утверждение. Справедливости ради следует заметить, что при спонтанной гипертензии (линия SHR) нормальное потребление кальция тоже сопровождается более интенсивной экспрессией NAP-22, но не нормальным АД.

К тому же, как мы показывали ранее [15], еще задолго до стойкого повышения АД, уже на ранних стадиях постнатального онтогенеза (от 5-го до 30-го дня после рождения), уровень экспрессии мРНК NAP-22 зависит и от наследственных факторов (SHR/WKY), и от потребления кальция. При этом, как и у взрослых животных, у крысят линии WKY недостаток поступления кальция с питьевой водой приводил к снижению экспрессии мРНК NAP-22 (не вызывая, однако, повышенного

АД). Любопытно, что у крысят SHR наблюдалось обратное: при дефиците кальция в питьевой воде экспрессия мРНК NAP-22 была более выражена. Таким образом, по меньшей мере, NAP-22 участвует не только в регуляции АД, но и в формировании АД на ранних этапах.

В настоящем исследовании мы отмечаем, что в почках взрослых крыс экспрессия мРНК NAP-22 и MARCKS в мозговом веществе в целом ниже, чем в корковом (табл. 3), что соответствует нашим ранее опубликованным данным [1], полученным на животных, потреблявших петербургскую водопроводную воду с низким содержанием кальция. Тем не менее, как показано в другой нашей работе [15], такие межструктурные различия устанавливаются лишь ко времени перехода детенышей на дефинитивное питание (примерно к 30-му дню постнатального развития). На более ранних этапах развития мозговое вещество экспрессирует NAP-22 в целом даже более интенсивно, чем корковое, причем поразному в зависимости от линии животных и режима потребления кальция.

Заметим, что и у взрослых крыс при восполнении недостатка кальция распределение MARCKS между слоями почек становится почти однородным (табл. 3). Особенно это касается крыс WKY, у которых при этом наблюдается и нормальное АД. Таким образом, по меньшей мере, для MARCKS выраженная неоднородность распределения между слоями почки в норме, по-видимому, не характерна.

Итак, при потреблении питьевой воды с нормальным содержанием кальция экспрессия мРНК изучаемых регуляторных белков в почках крыс линий SHR и WKY незначительно зависит как от наследственности (табл. 5), так и (в меньшей степени) от исследуемой структуры почки. Иными словами, достаточное потребление кальция является фактором, стабилизирующим экспрессию мРНК этих белков кальциевого каскада внутриклеточной сигнализации.

Недостаточное же поступление кальция в организм вызывает существенное снижение экспрессии мРНК NAP-22 и MARCKS, более ярко выраженное при спонтанной гипертензии, особенно в мозговом веществе. Это должно приводить [8] к увеличению цитоплазматической концентрации полифосфоинозитидов (а значит, и диацилглицерина и инозиттрифосфата), свободного кальмодулина и, парадоксальным образом, кальция.

Логичным путем компенсации неизбежно возникающих при этом метаболических нарушений было бы снижение активности ПКК: нефосфорилированные NAP-22 и MARCKS заякорены в клеточной мембране и препятствуют выходу полифосфоинозитидов в цитоплазму. И действительно, экспрессия ПКК снижается при спонтанной гипертензии [16, 17]. Другой логичный путь — повышение экспрессии NAP-22 и MARCKS [14].

Таким образом, более высокий уровень экспрессии мРНК исследуемых белков при потреблении питьевой воды с нормальным содержанием кальция у крыс SHR говорит об их возможном участии в компенсаторных процессах, противодействующих развитию патологических изменений в выделительной системе при спонтанной гипертензии, и повышение их экспрессии можно рассматривать как благоприятный показатель.

Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при достаточном поступлении в организм экзогенного кальция с питьевой водой экспрессия мРНК белков NAP-22 и MARCKS в почках крыс со спонтанной гипертензией находится на уровне, характерном для нормотензивных крыс. При потреблении же питьевой воды с недостаточным со-

держанием кальция этот показатель существенно снижается у обеих линий крыс, причем в большей степени при спонтанной гипертензии, особенно в мозговом веществе.

Таким образом, генетически детерминированные нарушения обмена кальция в клетках почек крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR) и их влияние на процессы внутриклеточной сигнализации сильнее проявляются при сниженном поступлении экзогенного кальция. При этом повышение экспрессии белков — мажорных субстратов ПКК при восполнении дефицита потребления экзогенного кальция — можно рассматривать как проявление компенсаторных процессов.

Финансирование / Funding

Работа выполнена в ФГБУН «Институт аналитического приборостроения РАН» в рамках Государственного задания 075–00780–19–02 по теме № 0074–2019–0013 Министерства науки и высшего образования РФ. / The work was carried out in the Institute for Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences within the framework of the Governmental Task 075–00780–19–02, the topic № 0074–2019–0013 of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Альдекеева А. С., Крайнова Ю. С., Руденко Е. Д., Ключева Н. З. Экспрессия мРНК белков MARCKS и NAP-22 в различных слоях почек крыс со спонтанной гипертензией. Артериальная гипертензия. 2018;24(4):435–440. doi:10.18705/1607-419X-2018-24-4-435-440 [Aldekeeva AS, Krainova YS, Rudenko ED, Klyueva NZ. MARCKS and NAP-22 proteins mRNA expression in renal cortex and renal medulla of rats with spontaneous hypertension. Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension. 2018;24(4):435–440. doi:10.18705/1607-419X-2018-24-4-435-440. In Russian].
2. McCarron DA, Hatton D, Roullet JB, Roullet C. Dietary calcium, defective cellular Ca²⁺ handling, and arterial pressure control. Can J Physiol Pharmacol. 1994;72(8):937–944.
3. Cox RH, Fromme S. Expression of calcium channel subunit variants in small mesenteric arteries of WKY and SHR. Am J Hypertens. 2015;28(10):1229–1239. doi:10.1093/ajh/hpv024
4. Hultström M. Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens. 2012;30(6):1087–1091. doi:10.1097/HJH.0b013e328352b89a
5. Lerman LO, Kurtz TW, Touyz RM, Ellison DH, Chade AR, Crowley SD et al. Animal models of hypertension: a scientific statement from the American Heart Association. Hypertension. 2019;73(6):e87–e120. doi:10.1161/HYP.000000000000090
6. Griffin KA. Hypertensive kidney injury and the progression of chronic kidney disease. Hypertension. 2017;70(4):687–694. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.08314

7. Чурина С. К. Эколого-физиологические аспекты формирования артериальной гипертензии в условиях Ленинграда (факты и гипотезы). Физиол. журн. СССР им. И. М. Сеченова. 1988;74(11):1615–1621 [Churina SK. Ecological and physiological aspects of arterial hypertension formation in Leningrad (facts and hypotheses). *Fiziologicheskii Zhurnal SSSR im. I. M. Sechenova = Physiol Zh SSSR named after I. M. Sechenov*. 1988;74(11):1615–1622. In Russian].

8. Laux T, Fukami K, Thelen M, Golub T, Frey D, Caroni P. GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5) P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J Cell Biol*. 2000;149(7):1455–1472. doi:10.1083/jcb.149.7.1455

9. Maekawa S, Sato C, Kitajima K, Funatsu N, Kumanogoh H, Sokawa Y. Cholesterol-dependent localization of NAP-22 on a neuronal membrane microdomain (raft). *J Biol Chem*. 1999;274(30):21369–21374.

10. Hartl M, Schneider RA. Unique family of neuronal signaling proteins implicated in oncogenesis and tumor suppression. *Front Oncol*. 2019;9:289. doi:10.3389/fonc.2019.00289

11. Fong LWR, Yang DC, Chen CH. Myristoylated alanine-rich C kinase substrate. (MARCKS): a multirole signaling protein in cancers. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(4):737–747. doi:10.1007/s10555-017-9709-6

12. Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OH. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*. 1995;91(1):161–170.

13. Чурина С. К., Есчанова Г. Т., Ключева Н. З., Рыжов Д. Б. Гипертензивная активность плазмы крови крыс линии WKY, содержащихся в условиях дефицита кальция в питьевой воде. Бюлл. эксп. биол. мед. 1993;115(2):137–141 [Churina SK, Eschanova GT, Kliueva NZ, Ryzhov DB. Hypertensive activity of blood plasma of WKY rats with a calcium deficiency in drinking water. *Biull Exp Biol Med*. 1993;115(2):137–143. In Russian].

14. Montgomery DS, Yu L, Ghazi ZM, Thai TL, Al-Khalili O, Ma HP et al. ENaC activity is regulated by calpain-2 proteolysis of MARCKS proteins. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017;313(1):C42–C53. doi:10.1152/ajpcell.00244.2016

15. Альдекеева А. С., Корнева Н. А., Руденко Е. Д., Ключева Н. З. Экспрессия мРНК NAP-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;20(5):401–405. doi:10.18705/1607-419X-2014-20-5-401-405 [Aldekeeva AS, Korneva NA, Rudenko ED, Klueva NZ. Expression of NAP 22 mRNA in kidney of spontaneously hypertensive rats (SHR line) and normotensive rats (WKY line) in early postnatal ontogenesis under normal exogenous calcium intake and its deficit. *Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension*. 2014;20(5):401–405. doi:10.18705/1607-419X-2014-20-5-401-405. In Russian].

16. Escriba PV, Sanchez-Dominguez JM, Alemany R, Perona JS, Ruiz-Gutierrez V. Alteration of lipids, G proteins, and PKC in cell membranes of elderly hypertensives. *Hypertension*. 2003;41(1):176–182. doi:10.1161/01.HYP.0000047647.72162

17. McCarron DA, Hatton D, Roullet JB, Roullet C. Dietary calcium, defective cellular Ca²⁺ handling, and arterial pressure control. *Can J Physiol Pharmacol*. 1994;72(8):937–944.

Информация об авторах

Альдекеева Анна Сергеевна — инженер 1-й категории лаборатории методов и приборов иммунного и генетического анализа ФГБУН «Институт аналитического приборостроения РАН», ORCID: 0000–0001–5076–4058;

Плеханов Антон Юрьевич — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биополимеров ФГБУН «НИЦ “Курчатовский институт” — ПИЯФ», ФГБУН «Институт высокомолекулярных соединений РАН», ORCID: 0000–0002–2459–4849;

Ключева Наталия Зиновьевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, руководитель группы экспериментальной кардиологии ФГБУН «Институт физиологии им. И. П. Павлова» РАН, ORCID: 0000–0001–7638–6104.

Author information

Anna S. Aldekeeva, Engineer of the 1st Category, Laboratory of Methods and Devices of Immune and Genetic Analysis, Institute for Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences, ORCID: 0000–0001–5076–4058;

Anton Y. Plekhanov, PhD in Biology Sciences, Researcher, Laboratory of Biopolymers, Petersburg Nuclear Physics Institute, Kurchatov Centre, Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, ORCID: 0000–0002–2459–4849;

Natalya Z. Klyueva, PhD in Biology Sciences, Senior Researcher, Experimental Cardiology Group, Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences, ORCID: 0000–0001–7638–6104.