

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

А.С. Альдекеева^{1,2}, Н.А. Корнева², Е.Д. Руденко¹, Н.З. Ключева¹

¹ Федеральное бюджетное государственное учреждение науки «Институт физиологии имени И.П. Павлова» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное бюджетное государственное учреждение науки «Институт аналитического приборостроения» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Альдекеева А.С. — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической кардиологии ФГБУН «Институт физиологии имени И.П. Павлова» РАН; Корнева Н.А. — младший научный сотрудник лаборатории методов и приборов иммунного и генетического анализа ФГБУН «Институт аналитического приборостроения» РАН; Руденко Е.Д. — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической кардиологии ФГБУН «Институт физиологии имени И.П. Павлова» РАН; Ключева Н.З. — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической кардиологии ФГБУН «Институт физиологии имени И.П. Павлова» РАН.

Контактная информация: ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, наб. Макарова, д. 6, Санкт-Петербург, Россия, 199034. E-mail: natkloveva@mail.ru (Ключева Наталья Зиновьевна).

Резюме

Цель исследования. Изучить изменения уровня экспрессии мРНК NAP-22 в почках крыс со спонтанной гипертензией в различные периоды раннего постнатального онтогенеза и оценить их зависимость от уровня поступления в организм экзогенного кальция. **Материалы и методы.** В работе использовали крыс линий SHR и WKY в возрасте 5, 13, 18 и 30 дней. Уровень мРНК NAP-22 определяли в корковом и мозговом слоях почек методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. **Результаты.** В период, предшествующий формированию стойкой артериальной гипертензии, у крыс линии SHR при достаточном поступлении кальция в организм уровень экспрессии мРНК NAP-22 в почках был ниже, чем у нормотензивных крыс. При дефиците поступающего кальция у крыс со спонтанной гипертензией уровень экспрессии мРНК NAP-22 существенно повышался по сравнению с нормотензивными WKY, у которых уровень экспрессии мРНК NAP-22 значимо снижался. **Выводы.** При дефиците экзогенного кальция у спонтанно гипертензивных крыс нарушается работа клеточного аппарата коркового слоя почек, о чем можно судить по компенсаторному увеличению уровня экспрессии мРНК NAP-22. Увеличение экспрессии мРНК NAP-22 у крыс SHR более выраженное, чем у WKY, можно связать с активацией внутриклеточных кальций-зависимых каскадов еще задолго до устойчивого повышения артериального давления.

Ключевые слова: спонтанная гипертензия, почки, дефицит экзогенного кальция, белок NAP-22, крысы линии SHR, онтогенез.

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

A.S. Aldekeeva^{1,2}, N.A. Korneva², E.D. Rudenko², N.Z. Klueva¹

¹ The Institute of Physiology named after I.P. Pavlov, St Petersburg, Russia

² The Institute of Analytical Instrument Making, St Petersburg, Russia

Corresponding author: The Institute of Physiology named after I.P. Pavlov, 6 Makarov embankment, St Petersburg, Russia 199034. E-mail: natklueva@mail.ru (Natalia Z. Klueva, Candidate of Biology, the Senior Researcher at the Laboratory of Experimental and Clinical Cardiology at the The Institute of Physiology named after I.P. Pavlov).

Abstract

In kidney of spontaneously hypertensive rats in early postnatal ontogenesis we studied the changes in the expression of NAP-22 quantitatively predominant protein kinase C substrate mRNA, which served us as an indicator of the severity of disruption in cell apparatus. Exogenous calcium deficiency increased the expression of NAP-22 mRNA. Based on the changes in the expression level of this protein, it can be resumed that disorders of kidney function precede the formation of lasting hypertension in the animals.

Key words: spontaneously hypertensive rats (SHR), kidney, early postnatal ontogenesis, protein NAP-22, calcium deficiency.

Статья поступила в редакцию 26.06.14 и принята к печати 20.07.14.

Введение

Решение проблемы развития артериальной гипертензии (АГ) и связанных с ней заболеваний в условиях дефицита поступающего в организм кальция невозможно без понимания молекулярных механизмов функционирования систем поддержания постоянства концентрации Ca^{2+} внутри клеток органов-мишеней (миокарда, почек и головного мозга). Ранее мы показали [1], что уже в раннем онтогенезе у спонтанно-гипертензивных крыс с генетически детерминированными нарушениями внутриклеточного гомеостаза кальция в нейронах конечного мозга наблюдается увеличение уровня белка NAP-22 (как в агрегированной, так и в неагрегированной его форме).

NAP-22 — это универсальный регуляторный белок, одна из главных мишеней протеинкиназы С — кальций-зависимого фермента, отвечающего за фосфорилирование белков и участвующего в передаче клеточного сигнала. В частности, NAP-22 обнаруживается в почках, и при нарушении функции почек отмечается изменение обмена этого белка [2]. В связи с этим изучение особенностей обмена NAP-22 в период раннего онтогенеза в почках крыс со спонтанной гипертензией может быть существенно для понимания процессов формирования АГ и вклада экзогенного кальция в эти процессы.

Вопрос о том, что в процессе формирования АГ является более важным — нарушения перфузии клубочкового аппарата или же внутриклеточные процессы в подоцитах гломерулярного аппарата и гладкомышечных клетках (ГМК) почечных артерий, непосредственно не связанные с уровнем мышечного тонуса, остается открытым. Для получения ответа на этот вопрос проводились исследования уровня митохондриальной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) белка NAP-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.

Белок NAP-22 ассоциирован с цитоскелетом [2], миристоилирован, в тканях почек локализован в ядре, возможно, его клеточная локализация и экспрессия зависят от типа клеток [3]. Хорошо изученный белок-супрессор опухоли Вильмса WT1, часто мутирующий при детских опухолях почек [4] и, предположительно, являющийся активатором или репрессором транскрипции [5], может взаимодействовать с белком NAP-22, который в этом случае функционирует как транскрипционный косупрессор WT1 [3]. Оба этих белка обнаруживаются и в подоцитах, что позволяет использовать уровень экспрессии мРНК NAP-22 в качестве показателя, отражающего различные патологические изменения в почках, в том числе связанные с сосудистым тонусом [1].

Известно, что в формировании спонтанной АГ у крыс линии SHR важную роль играет кальций, поступающий с пищей и водой [6]. Поэтому мы оценивали динамику экспрессии мРНК NAP-22 в условиях как нормального, так и сниженного потребления кальция.

Материалы и методы

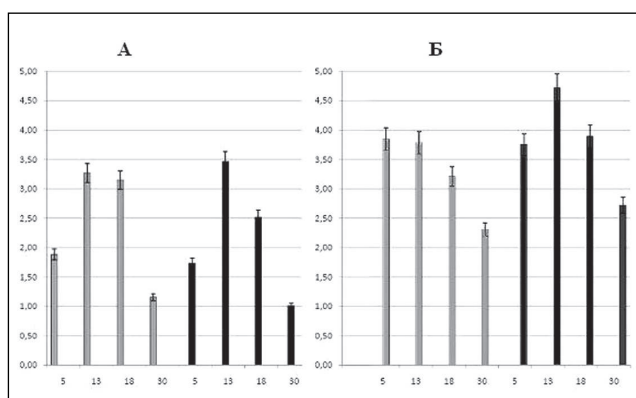
Исследование проводилось на крысах линии SHR и нормотензивных крысах (WKY) обоего пола от рождения до 30 дней (5, 13, 18 и 30 суток). Животные каждой линии были разделены на 2 группы. Первая группа на протяжении трех поколений получала воду с нормальным содержанием Ca^{2+} , соответствующим рекомендованным Всемирной организацией здравоохранения (80 мг/л). Вторая группа получала маломинерализованную воду с содержанием Ca^{2+} 8 мг/л. Содержание кальция в твердых кормах обеспечивало суточную норму потребления в обеих группах.

Уровень экспрессии мРНК NAP-22 определялся в корковом и мозговом слоях почек крыс обеих линий. Животные содержались в одной клетке с матерью при свободном доступе к корму и воде в условиях 12-часового светового дня.

В третьем поколении в обеих группах отбирались крысы в возрасте 5, 13, 18 и 30 дней для последующих исследований. Для исследования из каждого поколения опытной и контрольной групп были выбраны по 5 животных. Работа выполнена с использованием биологического материала и экспериментальных животных в соответствии с Хельсинкской декларацией (2008).

Отпрепарированные на льду фрагменты коркового и мозгового слоев почки использовались для выделения тотальной мРНК (Quick-RNA™ MiniPrep Kit, Zymo Research). Обратная транскрипция осуществлялась с помощью комплекта реагентов «РЕВЕРТА». Все операции по термостатированию и проведению полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени проводились в амплификаторе АНК-32 (ФГБУН «Институт аналитического приборостроения» РАН). Использовались опубликованные последовательности праймеров к NAP-22 и флуоресцентные зонды (ЗАО «Синтол», Россия). В качестве внутреннего контроля использовали ген β -актина. Разницу в экспрессии мРНК NAP-22 оценивали по методу Уилкоксона-Манна-Уитни. Значимыми считали различия, вероятность которых превосходила 95 % ($n = 12$, $U = 1$).

Рисунок 1. Уровень экспрессии мРНК NAP-22 в мозговом и корковом слоях почек крыс первой группы



Примечание: Представлены данные по крысам линии SHR (А) и крысам линии WKY (Б) различного возраста. Светло-серым цветом обозначены данные, полученные для коркового слоя, черным — результаты для мозгового слоя. Каждый столбец представляет усредненные данные ($M \pm m$) по 6 животным соответствующего возраста. По горизонтали обозначен возраст животных в днях, по вертикали отложен уровень экспрессии в условных единицах.

Результаты

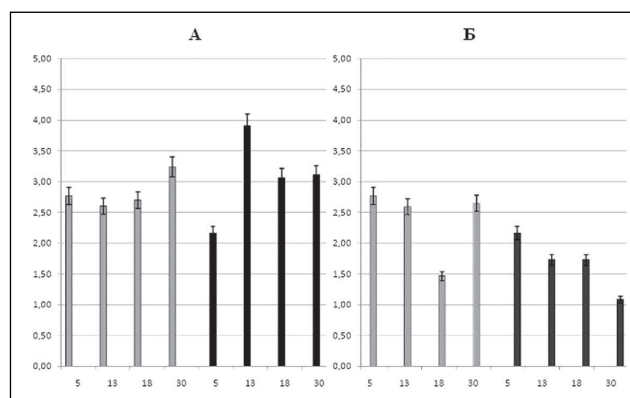
У крыс линии SHR в возрасте 13 дней, получающих достаточное количество кальция (первая группа) (рис. 1А), уровень экспрессии мРНК NAP-22 повышался как в корковом, так и в мозговом слое. В возрасте 18 дней в мозговом слое уровень экспрессии мРНК NAP-22 был существенно ниже, чем в корковом, а к 30 дням он становится ниже, чем на 5-й день после рождения.

У крыс линии WKY (рис. 1Б) экспрессия мРНК NAP-22 в обоих слоях изменялась сходным образом с аналогичным показателем для SHR, но была значительно выше ($p \leq 0,05$).

У животных, которые содержались в условиях дефицита кальция (вторая группа), межлинейные соотношения уровня экспрессии мРНК NAP-22 резко изменялись: у крыс линии SHR (рис. 2А) в обоих слоях этот уровень заметно выше, а у крыс линии WKY (рис. 2Б) ниже, чем у крыс первой группы (рис. 1).

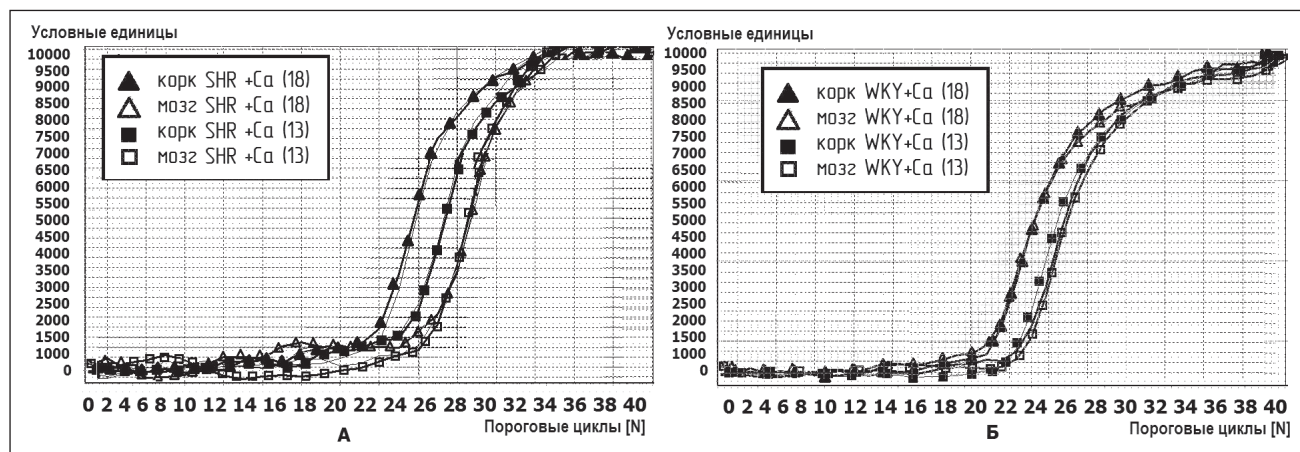
Зависимость интенсивности флуоресценции от порядка пороговых циклов в индивидуальных пробах отражает количество копий мРНК NAP-22, что позволяет представить результаты в более наглядной форме. У крыс линии SHR (рис. 3А) выявляется значимое различие ($p \leq 0,05$) в количестве копий в мозговом и корковом слоях, причем в последнем оно существенно выше. Это соотношение сохраняется и в возрасте 18 дней. У крыс линии WKY (рис. 3Б) такого различия не обнаруживается.

Рисунок 2. Уровень экспрессии мРНК NAP-22 в мозговом и корковом слоях почек крыс второй группы



Примечание: Представлены данные по крысам линии SHR (А) и крысам линии WKY (Б) различного возраста. Светло-серым цветом обозначены данные, полученные для коркового слоя, черным — результаты для мозгового слоя. Каждый столбец представляет усредненные данные ($M \pm m$) по 6 животным соответствующего возраста. По горизонтали обозначен возраст животных в днях, по вертикали отложен уровень экспрессии в условных единицах.

Рисунок 3. Количество копий мРНК NAP-22 в корковом и мозговом слоях почек крыс первой группы



Примечание: Представлены данные по крысам линии SHR (А) и линии WKY (Б) в возрасте 13 и 18 дней. По оси абсцисс показаны номера пороговых циклов полимеразной цепной реакции, по оси ординат — интенсивность сигнала в условных единицах.

Таким образом, были выявлены межлинейные различия в экспрессии мРНК NAP-22 в структурах почек крыс в онтогенезе, причем при нормальном поступлении кальция в организм у нормотензивных крыс этот показатель в возрасте до 30 дней был выше, чем у крыс линии SHR, а затем снижался.

Обсуждение

Можно предположить, что у нормотензивных крыс существуют компенсаторные механизмы, направленные на тонкую регуляцию уровня кальция в цитоплазме. Так, например, неблагоприятные процессы, ведущие к перегрузке цитозоля несвязанным кальцием, могли бы компенсироваться эффективной работой натрий-кальциевой аденозинтрифосфатазы (АТФ-азы) [7]. В таком случае увеличение активности каскадов, связанных с протеинкиназой С (ПКС), носит временный характер, что и отражается на динамике уровня экспрессии мРНК NAP-22.

При дефиците экзогенного кальция картина резко меняется: у крыс со спонтанной гипертензией уровень экспрессии мРНК NAP-22 существенно повышается, а у крыс линии WKY, напротив, заметно снижается.

В случае SHR это может объясняться тем, что у таких крыс имеются генетически детерминированные нарушения в работе кальциевых каналов в клетках почек [8, 9] и заметно ослаблена активность АТФ-аз [7]. У нормотензивных же крыс дефицит экзогенного кальция, по-видимому, запускал каскады компенсаторных механизмов, связанных в первую очередь с нормализацией концентрации несвязанного кальция в цитозоле, что приводило к уменьшению активности ПКС-зависимых каскадов

внутриклеточной сигнализации и, соответственно, к снижению экспрессии мРНК NAP-22.

Таким образом, изменение экспрессии мРНК NAP-22 при различных уровнях поступления кальция в организм может свидетельствовать о степени выраженности наследственных нарушений обмена кальция в клетках почек.

Выводы

1. На фоне наследственных нарушений обмена кальция в клетке снижение поступления Ca^{2+} является фактором, приводящим к нарушению работы клеточного аппарата коркового слоя почек, о чем можно судить по компенсаторному увеличению уровня экспрессии мРНК NAP-22.

2. Такое увеличение экспрессии мРНК NAP-22 можно связать с активацией внутриклеточных кальций-зависимых каскадов, которая у крыс SHR развивается задолго до устойчивого повышения артериального тонуса и находится в большей зависимости от уровня поступающего кальция, чем у нормотензивных крыс WKY.

Вопрос о роли сложных фильтрационно-реабсорбционных взаимоотношений, объема циркулирующей жидкости, регулируемого почками, водного и минерального обмена в процессе формирования АГ требует дополнительного изучения, так как в соответствии с полученными результатами они проявляются задолго до изменений в ГМК резистивных сосудов, ведущих к нарушению перфузии клубочкового аппарата.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литературы

1. Антонова О.С., Плеханов А.Ю., Петрова Е.И. и др. Структурные изменения белка NAP-22 — основного субстрата протеинкиназы С — при кальций-зависимых формах артериальной гипертензии // Артериальная гипертензия. — 2011. — Т. 17, № 4. — С. 342–346. / Antonova O.S., Plekhanov A.Y., Petrova E.I. et al. Structural modifications of a protein kinase C substrate, NAP-22 protein, in spontaneously hypertensive rats // Arterial Hypertension [Arterialnaya Gipertenziya]. — 2011. — Vol. 17, № 4. — P. 342–346 [Russian].
2. Widmer F., Caroni P. Identification, localization, and primary structure of CAP-23, a particle-bound cytosolic protein of early development // J. Cell Biol. — 1990. — Vol. 111, № 6, Pt. 2. — P. 3035–3047.
3. Carpenter B., Hill K.J., Charalambous M., Wagner K.J. et al. BASP1 is a transcriptional cosuppressor for the Wilms' tumour suppressor protein WT1 // Mol. Cell. Biol. — 2004. — Vol. 24, № 2. — P. 537–549.
4. Rivera M.N., Haber D.A. Wilms' tumour: connecting tumourigenesis and organ development in the kidney // Nat. Rev. Cancer. — 2005. — Vol. 5, № 9. — P. 699–712.
5. Roberts S.G.E. Transcriptional regulation by WT1 in development // Curr. Opin. Genet. Dev. — 2005. — Vol. 15, № 5. — P. 542–547.
6. Чурина С.К. Эколого-физиологические аспекты формирования артериальной гипертензии в условиях Ленинграда (факты и гипотезы) // Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. — 1988. — Т. 74, № 11. — С. 1615–1621. / Tchurina S.K. Ecological and physiological aspects of the arterial hypertension prevalence in Leningrad (facts and hypotheses) // I.M. Sechenov Physiol. J. USSR [Fiziologicheskii Zhurnal SSSR imeni I.M. Sechenova]. — 1988. — Vol. 74, № 11. — P. 1615–1621 [Russian].
7. Hinojos C.A., Doris P.A. Altered subcellular distribution of Na⁺,K⁺-ATPase in proximal tubules in young spontaneously hypertensive rats // Hypertension. — 2004. — Vol. 44, № 1. — P. 95–100.
8. Hayashi K., Wakino S., Sugano N. et al. Ca²⁺ channel subtypes and pharmacology in the kidney // Circ. Res. — 2007. — Vol. 100, № 3. — P. 342–353.
9. Hayashi K., Wakino S., Ozawa Y. et al. Ca channels and PKC in hypertension // Keio J. Med. — 2005. — Vol. 54, № 2. — P. 102–108.