

УДК 575.117.2:612.821.33:616.12-008.333.1

СНИЖЕННЫЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ТОНУС СОСУДОВ В ПОЧКАХ КРЫС НИСАГ СО СТРЕСС-ЗАВИСИМОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

© 2014 г. О.Е. Редина¹, Л.О. Климов¹, Н.И. Ершов¹, Т.О. Абрамова¹,
Л.Н. Иванова^{1,2}, А.Л. Маркель^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: oredina@ngs.ru;

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 16 сентября 2014 г. Принята к публикации 3 октября 2014 г.

Сравнивали транскрипционную активность генов в почках гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс WAG для определения генов-кандидатов стресс-зависимой артериальной гипертензии, которые достоверно экспрессируются в почках только одной из двух сравниваемых линий. Анализ экспрессии генов проведен на микрочипах Illumina (USA). При анализе транскрипционной активности генов в корковом веществе почек выявлено три гена (*Klk1*, *Klk1c10* и *Kng1*), имеющих отношение к функционированию калликреин-кининовой системы. Все три гена достоверно экспрессировались в почках нормотензивных крыс, в почках гипертензивных крыс их экспрессия не детектировалась. Снижение уровня экспрессии этих генов и гена *Gucy1a3* у гипертензивных крыс позволяет предполагать ослабление функции калликреин-кининовой системы у крыс НИСАГ, что может нарушать гемодиализацию в почечных тельцах и способствовать развитию гипертензии. В мозговом веществе почек функциональная аннотация генов, достоверно экспрессирующихся только у одной из двух сравниваемых линий, показала различия в экспрессии генов регуляции иммунного ответа.

Ключевые слова: крысы НИСАГ, транскрипционная активность генов, микрочипы, артериальная индуцируемая стрессом гипертензия, эмоциональный стресс.

ВВЕДЕНИЕ

Гипертоническая болезнь (ГБ) – одно из самых распространенных заболеваний, характеризуется стойким повышением артериального давления (АД). Причины ГБ, или эссенциальной гипертензии, в отличие от вторичных гипертензий, по-прежнему остаются неизвестными, хотя основные механизмы регуляции АД у человека и млекопитающих хорошо изучены (Guyton, 1990; Cowley, 1992; Lifton *et al.*, 2001). Гипертоническая болезнь характеризуется наличием выраженной генетической компоненты (до 50 % изменчивости) (Navlik *et al.*, 1979; Levy *et al.*, 2000). Анализ генов-кандидатов,

как и полногеномные исследования на больших популяциях людей, показали сложную полигенную детерминацию заболевания (Hirschhorn, 2005; Levy *et al.*, 2009; Newton-Cheh *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Развитие ГБ обусловлено действием большого числа генов, каждый из которых вносит лишь небольшой вклад в патогенез заболевания. В итоге ГБ формируется в результате взаимодействия многих средовых и генетических факторов (Mullins *et al.*, 2006), при этом многие гены изменяют уровень своей экспрессии (Lynn *et al.*, 2009).

Для изучения физиологических и молекулярно-генетических механизмов развития артериальной гипертензии в условиях эмоционального

стресса нами получена экспериментальная модель стресс-зависимой артериальной гипертензии – линия крыс с наследуемой индуцируемой стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ, или ISIAH) (Markel, 1992). При создании линии НИСАГ селекцию проводили на повышение АД при действии мягкого эмоционального стресса, вызванного получасовой рестрикцией крысы в тесной проволочной клетке. К настоящему времени получено более 30 поколений инбридинга.

Показано, что линия НИСАГ высокоинбредная (Адаричев и др., 1996), характеризуется повышенным АД в покое ($175,0 \pm 3,5$ мм рт. ст. у самцов и $165,0 \pm 3,0$ у самок) и его значительным повышением в условиях мягкого эмоционального стресса (до $195,0 \pm 2,4$ мм рт. ст. у самцов и $174,0 \pm 3,2$ мм рт. ст. у самок). Крысы НИСАГ имеют специфические для ГБ морфологические изменения органов, в том числе изменения морфологии почек, гипертрофию левого желудочка сердца (Markel *et al.*, 1999; Шмерлинг и др., 2001; Филюшина и др., 2013). У крыс НИСАГ изменен уровень катехоламинов в надпочечниках и плазме крови (Маркель и др., 2006; Markel *et al.*, 2007).

Ранее установлено, что у крыс НИСАГ по сравнению с контрольными крысами WAG (Wistar Albino Glaxo) изменена экспрессия некоторых генов, регулирующих гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему (Хворостова и др., 2002, 2003; Markel *et al.*, 2007), а также ряда генов, контролирующих состояние симпатической нервной системы, сосудистого тонуса и водно-солевого баланса (Пыльник и др., 2011; Федосеева и др., 2011; Абрамова и др., 2013).

Важную роль при развитии ГБ играет функциональное состояние почек. Они контролируют баланс натрия, объем циркулирующей крови и внеклеточной жидкости, что является ключевым механизмом регуляции АД (Mullins *et al.*, 2006). Хронические заболевания почек представляют серьезный фактор риска для развития заболеваний сердечно-сосудистой системы, включая ГБ, инфаркт миокарда, мозговой инсульт (Korstanje, DiPetrillo, 2004). Для изучения молекулярно-генетических механизмов регуляции физиологических и патофизиологических процессов всё более широко используют сравнительный анализ уровня экспрессии мРНК

генов на микроматрицах (Bareyre, Schwab, 2003; Park, Prolla, 2005; Viemann *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2006). Для оценки дифференциальной транскрипционной активности генов почки у гипертензивных крыс НИСАГ и контрольных крыс WAG проведен сравнительный анализ экспрессии генов на микроматрицах Illumina (USA). Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов в почках гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс WAG показал, что эти линии отличаются по экспрессии генов, имеющих отношение к регуляции ответа на стресс, регуляции ионного транспорта, функции иммунной системы (Redina *et al.*, 2014). В ранее проведенном анализе были рассмотрены дифференциально экспрессирующиеся гены с достоверно детектируемой экспрессией у крыс обеих линий ($p < 0,01$) (Redina *et al.*, 2014). Однако можно предполагать, что некоторые гены, определяющие различия в функциональном состоянии почек гипертензивных и контрольных крыс, могут достоверно экспрессироваться только в одной из линий. Цель настоящей работы – выявление генов-кандидатов стресс-зависимой артериальной гипертензии, которые достоверно экспрессируются в почках только одной из двух сравниваемых линий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

В эксперименте использовали крыс гипертензивной линии НИСАГ и нормотензивной линии WAG. В каждой группе было по три животных-самца в возрасте 6–7 мес. Систолическое АД измеряли непрямым методом на хвосте (tail-cuff method), оно составило $173,67 \pm 1,86$ мм рт. ст. у крыс НИСАГ и $124,67 \pm 2,67$ мм рт. ст. у крыс WAG. Крысы содержались в стандартных условиях в виварии ИЦиГ СО РАН, воду и сбалансированный корм получали без ограничения. Эксперименты выполнены в соответствии с международными Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. Анализ экспрессии генов проведен отдельно в двух отделах почки – в корковом и мозговом веществе. Для получения образцов тканей крыс декапитировали, быстро выделяли

почку, на поперечном срезе разделяли корковое и мозговое вещество. Сразу после выделения образцы тканей (50 мг) гомогенизировали в 1 мл тризола (TRIzol reagent, Invitrogen Life Technologies, USA) и хранили при -70°C до выделения РНК.

Анализ микрочипов

Образцы тканей посылали в специализированную компанию ЗАО «Геноаналитика» (г. Москва, Россия), где проводили выделение РНК и технологическую часть эксперимента. Для реакции амплификации использовали 400 нг РНК и TotalPrep RNA Labeling Kit с Biotinylated-UTP (Ambion, Austin, TX). Гибридизацию осуществляли на микрочипах RatRef-12 Expression BeadChip (Illumina, Inc., California, USA), включающих 22 524 пробы для 22 228 генов крысы. Последовательности проб были выбраны из базы данных National Center for Biotechnology Information RefSeq database (Release 16; Illumina, San Diego, CA, USA). Гибридизацию, отмывку и окрашивание флуоресцентным реагентом Cy3-стрептавидином проводили в соответствии с рекомендациями Illumina Gene Expression Direct Hybridization Manual. Гибридизацию всех сравниваемых образцов одной ткани проводили на одном стекле. Результаты гибридизации на микрочипах сканировали с помощью Illumina BeadArray reader.

Статистическую обработку результатов гибридизации, включая $\log_2$ -трансформацию и нормализацию методом квантилей, проводили с помощью программного пакета R/Bioconductor: beadarray (Dunning *et al.*, 2007). Дифференциальную экспрессию генов анализировали с помощью программного пакета R/Bioconductor: limma (Smyth, 2004) с применением эмпирического байесовского подхода и поправки Бенжамини – Хохберга. Для отбора генов, экспрессирующихся в почках только одной из сравниваемых линий, использовали сортировку по параметру ‘detection’ p -value, который должен быть меньше 0,01 для всех образцов одной линии (достоверная детекция) и больше 0,1 для всех образцов другой линии (недостоверная детекция). Достоверными считали различия при скорректированном уровне значимости $p \leq 0,05$. Для функциональной аннотации дифференци-

ально экспрессирующихся генов применяли Web-инструмент DAVID 2008 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) с использованием стандартных значений уровней значимости обогащения терминами GO (Gene Ontology) $\leq 0,1$ (Huang *et al.*, 2009a, b).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Список генов, достоверно экспрессирующихся в почках только одной из двух сравниваемых линий, представлен в табл. 1. У НИСАГ было репрессировано 20 генов, и восемь генов репрессировано у WAG в корковом веществе почки. В мозговом веществе почки 9 генов репрессировано у НИСАГ и три гена – у WAG.

Среди генов, достоверно экспрессирующихся в почках только одной из двух сравниваемых линий, шесть генов были общими в корковом и мозговом веществе почек. Все 6 генов (*Ank2*, *Ctla2a*, *Gucy1a3*, *Loc498449*, *Rpl30*, *RT1-A2*) были репрессированы у крыс НИСАГ.

Сравнение генов, достоверно экспрессирующихся в почках только одной из двух анализируемых линий крыс, со списком генов, аннотированных в базе данных RGD как гены, имеющие отношение к развитию ГБ, показало, что только ген *Klk1* входит в этот список. Кроме того, гены *Klk1* и *Kng1* аннотированы в базе данных RGD как имеющие отношение к заболеваниям почек – нефросклерозу (*Klk1* и *Kng1*) и почечной недостаточности (*Klk1*).

Среди генов, представленных в табл. 1, четыре гена в корковом веществе почек связаны с уровнем напряжения сосудистой стенки, возникающего в ответ на движение крови (shear stress) (Ekstrand *et al.*, 2010). Проведение функциональной аннотации генов, достоверно экспрессирующихся в почках только одной из двух сравниваемых линий, с помощью Web-инструмента DAVID позволило выявить несколько биологических процессов, характеризующих различия функции почек у гипер- и нормотензивных крыс (табл. 2).

Анализ коркового вещества почек выявил два гена (*Gucy1a3* и *Kng1*), достоверно экспрессирующихся только у нормотензивных крыс и участвующих в контроле вазодилатации и диаметра кровеносных сосудов. Кроме того, функциональная аннотация показала, что ген

Таблица 1

Гены, экспрессирующиеся в почках только у одной из сравниваемых линий
крыс НИСАГ и WAG

Chr.	Acc.#	Символ гена	Название гена	Экспрессия	
				НИСАГ	WAG
kidney_cortex					
X	NM_207595.1	<i>Ankra2</i>	ankyrin repeat, family A (RFXANK-like), 2	Нет	Да
9	XM_001063205.1	<i>Bnip3-ps1</i>	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3, pseudogene 1	Нет	Да
19	NM_019293.1	<i>Car5a</i>	carbonic anhydrase 5a, mitochondrial	Нет	Да
17	XM_001065725.1	<i>Ctla2a</i>	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	Нет	Да
2	XM_579393.1	<i>Gucyl1a3</i>	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	Нет	Да
19	XM_238042.4	<i>Hhip</i>	Hedgehog-interacting protein	Нет	Да
1	NM_001005382.1	<i>Klk1*#</i>	kallikrein 1	Нет	Да
1	XM_001080455.1	<i>Klk1c10</i>	kallikrein 1-related peptidase C10	Нет	Да
11	NM_012696.2	<i>Kngl#</i>	kininogen 1	Нет	Да
17	XM_346949.2	<i>LOC361229</i>	hypothetical LOC361229	Нет	Да
12	XM_344072.2	<i>LOC363865</i>	similar to tumor protein, translationally-controlled 1	Нет	Да
15	XM_573708.1	<i>LOC498449</i>	similar to Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1 (Ubiquitin-protein ligase E1)	Нет	Да
16	XM_001071886.1	<i>LOC689753</i>	similar to K06A9.1b	Нет	Да
X	XR_007560.1	<i>RGD1560706</i>	similar to LRRGT00057	Нет	Да
2	XM_001058612.1	<i>RGD1564247^A</i>	similar to SUMO/sentrin specific protease 5	Нет	Да
17	XM_573998.2	<i>Rnf182</i>	ring finger protein 182	Нет	Да
7	NM_022699.2	<i>Rpl30</i>	ribosomal protein L30	Нет	Да
20	NM_001008829.1	<i>RT1-A2</i>	RT1 class Ia, locus A2	Нет	Да
20	NR_002149.1	<i>Sfta2</i>	surfactant associated 2	Нет	Да
3	NM_053372.1	<i>Slpi</i>	secretory leukocyte peptidase inhibitor	Нет	Да
4	NM_173136.1	<i>Akr1b8^A</i>	aldo-keto reductase family 1, member B8	Да	Нет
1	NM_001025767.1	<i>Blnk</i>	B-cell linker	Да	Нет
1	XM_574627.2	<i>Fam111a^A</i>	family with sequence similarity 111, member A	Да	Нет
7	XM_216959.2	<i>LOC300024</i>	similar to Ly6-B antigen gene	Да	Нет
19	XM_226326.3	<i>LOC307731</i>	similar to L-lactate dehydrogenase A chain (LDH-A) (LDH muscle subunit) (LDH-M)	Да	Нет
20	XM_574750.1	<i>LOC365566</i>	similar to Ubiquitin-conjugating enzyme E2S	Да	Нет
17	XR_006738.1	<i>LOC689842^A</i>	similar to Nucleolar GTP-binding protein 1 (Chronic renal failure gene protein) (GTP-binding protein NGB)	Да	Нет
1	NM_022715.2	<i>Mvp</i>	major vault protein	Да	Нет
kidney_medulla					
X	NM_207595.1	<i>Ankra2</i>	ankyrin repeat, family A (RFXANK-like), 2	Нет	Да
16	NM_053770.1	<i>Argbp2</i>	Arg/Abl-interacting protein ArgBP2	Нет	Да
17	XM_001065725.1	<i>Ctla2a</i>	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	Нет	Да
2	XM_579393.1	<i>Gucyl1a3</i>	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	Нет	Да
15	XM_573708.1	<i>LOC498449</i>	similar to Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1 (Ubiquitin-protein ligase E1)	Нет	Да
1	XM_214751.3	<i>Mrpl18</i>	mitochondrial ribosomal protein L18	Нет	Да
7	NM_022699.2	<i>Rpl30</i>	ribosomal protein L30	Нет	Да
20	NM_001008829.1	<i>RT1-A2</i>	RT1 class Ia, locus A2	Нет	Да
20	XM_001055146.1	<i>Spock2</i>	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 2	Нет	Да

Окончание таблицы 1

Chr.	Acc.#	Символ гена	Название гена	Экспрессия	
				НИСАГ	WAG
1	NM_133539.1	<i>Mrpl17</i>	mitochondrial ribosomal protein L17	Да	Нет
20	NM_053299.1	<i>Ubd</i>	ubiquitin D	Да	Нет

* Гены аннотированы в базе данных RGD как имеющие отношение к развитию гипертонии.

Гены аннотированы в базе данных RGD как имеющие отношение к развитию заболеваний почек.

Δ Гены, изменяющие уровень экспрессии в гладкомышечных клетках в ответ на воздействие fluid shear stress, т. е. силы, действующей на объект в результате движения жидкости по жесткой поверхности (Ekstrand *et al.*, 2010).

Kncl участвует в регуляции клеточной адгезии, ответа на стресс и в регуляции биологических процессов, включая иммунные. В мозговом веществе почек функциональная аннотация генов, достоверно экспрессирующихся в почках одной из двух сравниваемых линий, показала различия в экспрессии генов регуляции иммунного ответа у гипер- и нормотензивных крыс.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе выявлены гены, достоверно экспрессирующиеся в почках только одной линии – гипертензивных крыс НИСАГ или нормотензивных крыс WAG. Транскрипционная активность большинства таких генов не детектирована в почках гипертензивных крыс – 71,4 % в корковом и 75,0 % в мозговом веществе почки. Снижение уровня экспрессии многих генов (67 % из 505 проанализированных генов) было показано при старении почек, что ассоциировано с проявлением таких процессов, как гломерулосклероз, атрофия почечных канальцев, фиброзные изменения в мелких артериях (Melk *et al.*, 2005).

Сравнительные электронно-микроскопические исследования у взрослых (6 мес.) крыс НИСАГ и Wistar показали гипертрофию почечных телец в гипертензивной почке крыс НИСАГ, сопровождающуюся множественными структурными изменениями. Комплекс этих изменений указывал на увеличение функциональной нагрузки на фильтрационный барьер и начальные стадии гломерулярного (Шмерлинг и др., 2001) и реномедулярного склероза (Филюшина и др., 2013) в почках крыс НИСАГ. Снижение уровня транскрипционной активности ряда генов может быть связано с функциональными

нарушениями в почках крыс НИСАГ. Снижение транскрипционной активности большого числа генов было показано также при исследовании животных с ГБ, индуцированной внешними воздействиями, например при инъекции ангиотензина-II (Yuan *et al.*, 2003; Makhanova *et al.*, 2010) или солевой нагрузке (Horscroft *et al.*, 2010). В эксперименте с солевой нагрузкой снижение экспрессии многих генов связывали с адаптацией организма, направленной против развития гипертонии (Там же).

В отличие от моделей индуцируемой гипертонии, в генетических моделях, таких как крысы НИСАГ, артериальная гипертензия является результатом селекции, в процессе которой мог произойти отбор определенных полиморфизмов, приводящих к изменению (повышению или понижению) уровня экспрессии генов и могущих отражаться на изменении синтеза функциональных белков, вызывая наблюдаемые у крыс НИСАГ отклонения в фенотипе. Однако отбор по определенному признаку в процессе селекции, как правило, влечет за собой и приобретение ряда признаков, контролируемых генами, тесно сцепленными с теми, по которым идет отбор. Исходя из этого нельзя исключить, что выявленные различия в экспрессии ряда генов, представленных в данной работе (см. табл. 1), могут быть обусловлены случайными генными вариациями, не связанными непосредственно с регуляцией уровня артериального давления. Функции многих генов, описанных в настоящей работе как дифференциально экспрессирующиеся в почках гипер- и нормотензивных крыс, не известны. Однако анализ генов с известной функцией позволил выявить ряд важных особенностей в функционировании генов гипертензивной почки. В настоящей работе при анализе

Таблица 2

Функциональная аннотация генов, достоверно экспрессирующихся в почках только одной из двух сравниваемых линий НИСАГ и WAG

Термины GO	Число генов	p-value	Символ гена	Название гена
Корковое вещество почек				
Regulation of response to stress	3	1,9E-2	<i>RT1-A2</i> <i>Klk1</i> <i>Knlg1</i>	RT1 class I, CE14; RT1 class I, CE16; RT1 class Ia, locus A2; RT1 class Ib, locus Cl; RT1 class Ia, locus A1; RT1 class I, A3 Kallikrein 1 Kininogen 1
Vasodilation, regulation of blood vessel size	2	2,5E-2	<i>Gucyl1a3</i> <i>Knlg1</i>	Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3 Kininogen 1
Negative regulation of cell adhesion	2	2,8E-2	<i>Knlg1</i> <i>LOC689842</i>	Kininogen 1 Similar to Nucleolar GTP-binding protein 1 (Chronic renal failure gene protein) (GTP-binding protein NGB); similar to G protein-binding protein CRFG; GTP binding protein 4; similar to isopentenyl diphosphate delta-isomerase type 2
Negative regulation of biological process	5	4,0E-2	<i>Hhip</i> <i>RT1-A2</i> <i>Gucyl1a3</i> <i>Knlg1</i> <i>LOC689842</i>	Hedgehog-interacting protein RT1 class I, CE14; RT1 class I, CE16; RT1 class Ia, locus A2; RT1 class Ib, locus Cl; RT1 class Ia, locus A1; RT1 class I, A3 Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3 Kininogen 1 Similar to Nucleolar GTP-binding protein 1 (Chronic renal failure gene protein) (GTP-binding protein NGB); similar to G protein-binding protein CRFG; GTP binding protein 4; similar to isopentenyl diphosphate delta-isomerase type 2
Negative regulation of immune system process	2	7,1E-2	<i>RT1-A2</i> <i>Knlg1</i>	RT1 class I, CE14; RT1 class I, CE16; RT1 class Ia, locus A2; RT1 class Ib, locus Cl; RT1 class Ia, locus A1; RT1 class I, A3 Kininogen 1
Мозговое вещество почек				
Negative regulation of immune response	2	1,8E-2	<i>RT1-A2</i> <i>A2m</i>	RT1 class I, CE14; RT1 class I, CE16; RT1 class Ia, locus A2; RT1 class Ib, locus Cl; RT1 class Ia, locus A1; RT1 class I, A3 Alpha-2-macroglobulin

транскрипционной активности генов в корковом веществе почек обнаружено три гена (*Klk1*, *Klk1c10* и *Knlg1*), имеющих отношение к функционированию калликреин-кининовой системы (ККС) организма. Все три гена достоверно экспрессировались в почках нормотензивных крыс. В почках гипертензивных крыс их экспрессия не детектировалась. Калликреин-кининовая система является ключевой протеолитической системой, участвующей в регуляции широкого

спектра физиологических функций и развитии многих патологических состояний (Елисеева, 2001). Она ингибирует апоптоз, воспалительные процессы, развитие гипертрофии и фиброза и стимулирует ангио- и нейрогенез в сердце, почках, мозге и кровеносных сосудах (Chao, Chao, 2005). В базе данных RGD ген *Klk1* аннотирован как имеющий отношение к развитию ГБ и таким заболеваниями почек, как фиброз и почечная недостаточность. Сниженный уровень

тканевого калликреина отмечают у человека и модельных животных с гипертонией, а также с заболеваниями сердечно-сосудистой системы и почек (Chao, Chao, 2005; Iwai *et al.*, 2005).

У крыс со спонтанной гипертензией (SHR) было показано снижение АД при воздействии калликреина (Wang *et al.*, 1995). Усиление функции ККС в результате введения калликреина крысам с соль-чувствительной гипертонией линии SS (Dahl salt-sensitive rats) в течение длительного времени ослабляло у них повреждение почек (Uehara *et al.*, 1997). Установлено, что при этом происходят обратное развитие повреждений канальцевого аппарата и инволюция склеротических нарушений гломерулярного аппарата почки (Chao *et al.*, 1998).

Кининоген активирует пролиферацию эндотелиальных клеток (Pérez *et al.*, 2006) и фибробластов (Aravena *et al.*, 2005) и подавляет пролиферацию лимфоцитов (Acuna-Castillo *et al.*, 2005). Давно показано, что злокачественная ГБ ассоциирована с низким уровнем кининогена в плазме крови (Almeida *et al.*, 1981). Под действием калликреинов из кининогенов высвобождаются биологически активные пептиды-кинины, например брадикинин, обладающий сосудорасширяющим действием. Брадикинин служит мощным стимулятором высвобождения эндотелий-зависимых расслабляющих факторов, таких как оксид азота (NO), эндотелий-зависимый фактор гиперполяризации и простациклин (Bönner *et al.*, 1990).

Gucyl3 (guanylate cyclase soluble subunit $\alpha 3$) кодирует альфа-субъединицу растворимой гуанилатциклазы. Активируя последнюю, NO увеличивает образование циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) в гладкомышечных клетках, что приводит к расслаблению гладких мышц сосудов, их расширению и снижению АД (Rapoport *et al.*, 1983).

Ранее при изучении структурных особенностей капилляров почечных клубочков крыс НИСАГ выявлены снижение количества капилляров и их неравномерное распределение в клубочках. Было сделано заключение, что найденные изменения гломерулярных капилляров и примыкающих к ним подо- и мезангиоцитов свидетельствуют о нарушении функции гломерулярного фильтра и соответствуют морфологическим признакам гломерулосклероза (Лазарев

и др., 2002). Можно предположить, что снижение уровня экспрессии генов *Klk1*, *Kng1* и *Gucyl3* в корковом веществе почек крыс НИСАГ может нарушать процессы циркуляции крови в почечных тельцах и участвовать в процессе развития гипертензивного состояния.

В мозговом веществе почек среди генов с достоверно различающейся экспрессией у крыс НИСАГ и WAG найдены гены (*RT1-A2*, *A2m*), относящиеся к регуляции иммунного ответа. В настоящее время активно изучается и показана важная роль воспалительных процессов в развитии эссенциальной ГБ (Androulakis *et al.*, 2011). Воспаление и оксидативный стресс могут участвовать в процессах ремоделирования и повреждения сосудов при ГБ (Toyz, 2004). Ген *RT1-A2* локализован на хромосоме 20 в локусе АД Bp195, описанном при картировании соль-зависимой гипертензии (Moreno *et al.*, 2003).

Ген *A2m* локализован на хромосоме 4 и также попадает в локусы АД, описанные в исследованиях при изучении соль-зависимой ГБ (Schork *et al.*, 1995; Garrett *et al.*, 2002). Ген *A2m* кодирует белок, являющийся главным ингибитором металлопротеиназ. Изменения баланса металлопротеиназ и их ингибиторов могут быть связаны с ремоделированием сосудов при экспериментальной ГБ, обусловленной сужением почечной артерии одной из почек (two kidney-one clip hypertension - 2K-1C) (Castro *et al.*, 2010). Как показано нами, у крыс НИСАГ локус, достоверно ассоциированный с уровнем АД в покое и после воздействия эмоционального стресса, находится на хромосоме 1 и пересекается с локусом относительного веса селезенки, что указывает на возможную связь развития стресс-зависимой гипертензии у крыс НИСАГ с изменением генетического контроля функции селезенки (Редина и др., 2014).

Известно, что при ГБ наблюдается эндотелиальная дисфункция (Ghiadoni *et al.*, 2012). Экспрессия генов и белков в эндотелиальных (Chiu *et al.*, 2009) и гладкомышечных клетках (Ekstrand *et al.*, 2010) может изменяться при воздействии, оказываемом движущейся кровью на стенки сосудов (shear stress). При таком воздействии в гладкомышечных клетках изменяется экспрессия многих генов, ассоциированных с ответом на оксидативный стресс и с гипоксией (Ekstrand *et al.*, 2010).

В настоящей работе в корковом веществе почек найдено четыре гена, которые изменяют уровень экспрессии в гладкомышечных клетках при увеличении стресса «трения крови» (shear stress) (см. табл. 1). Эти гены могут быть рассмотрены как гены-кандидаты для дальнейших исследований функции гладкомышечных и эндотелиальных клеток сосудов в почках гипертензивных крыс НИСАГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования детерминации генетического контроля заболеваний и физиологических признаков, проведенные на модельных животных, могут иметь прямое отношение к изучению механизмов патологии человека (Korstanje, DiPetrillo, 2004). Сходство генетического контроля некоторых заболеваний человека и животных подтверждается сходством списков генов, аннотированных в базе данных RGD как гены, ответственные за развитие целого ряда заболеваний, в том числе и артериальной гипертензии (<http://rgd.mcw.edu>).

Мы предполагаем, что в дальнейшей работе среди выявленных нами генов с дифференциальной экспрессией в почках крыс НИСАГ и WAG будут определены дополнительные гены-кандидаты стресс-зависимой гипертензии, а также найдены полиморфизмы, потенциально связанные с процессами ремоделирования стенки сосудов и старения почек. Изучение генетической базы гипертензивных состояний у экспериментальных животных расширяет наши знания о причинах и механизмах развития ГБ человека.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-01492 и бюджетным проектом VI.53.2.4.

Авторы выражают благодарность компании «ЗАО Геноаналитика» за проведение технологической части анализа микрочипов.

ЛИТЕРАТУРА

- Абрамова Т.О., Редина О.Е., Смоленская С.Э., Маркель А.Л. Повышенный уровень экспрессии мРНК гена *Ephx2* в почках гипертензивных крыс линии НИСАГ (ISIAH) // Молекул. биология. 2013. Т. 47. № 6. С. 942–948.
- Адаричев В.А., Корохов Н.П., Остапчук В. и др. Характеристика линий крыс с нормотензивным и гипертензивным статусом методом геномного фингерпринтинга // Генетика. 1996. Т. 32. С. 1669–1677.
- Елисеева Е. Ангиотензин-превращающий фермент, его физиологическая роль // Вопросы медицинской химии. 2001. Т. 47. № 1. С. 43–54.
- Лазарев В.А., Филюшина Е.Е., Бузуева И.И. и др. Структурные особенности капилляров почечных клубочков крыс гипертензивной линии НИСАГ // Бюл. СО РАМН. 2002. № 1. С. 89–92.
- Маркель А.Л., Калашникова Е.В., Горякин С.В. и др. Характеристика функциональной активности симпатoadреналовой системы у гипертензивных крыс линии НИСАГ // Бюл. эксперим. биол. мед. 2006. Т. 141. № 3. С. 244–247.
- Пыльник Т.О., Плетнева Л.С., Редина О.Е. и др. Влияние эмоционального стресса на экспрессию мРНК гена альфа-ЕNaС в почке гипертензивных крыс линии НИСАГ // Доклады Академии наук. 2011. Т. 439. № 4. С. 563–565.
- Редина О.Е., Смоленская С.Э., Абрамова Т.О., Маркель А.Л. Генетические локусы, контролирующие вес селезенки и уровень артериального давления у крыс НИСАГ со стресс-зависимой артериальной гипертензией // Молекулярная биология. 2014. Т. 48. № 3. С. 407–415.
- Федосеева Л.А., Рязанова М.А., Антонов Е.В. и др. Экспрессия генов рениновой системы почки и сердца у гипертензивных крыс линии НИСАГ // Биомедицинская химия. 2011. Т. 57. № 4. С. 410–419.
- Филюшина Е.Е., Шмерлинг М.Д., Бузуева И.И. и др. Структурные особенности реномедуллярных интерстициальных клеток крыс гипертензивной линии НИСАГ // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. 2013. Т. 155. № 3. С. 391–396.
- Хворостова В., Горякин С.В., Петрова Г.В. и др. Характеристика гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы у гипертензивных крыс линии НИСАГ // Российск. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2002. Т. 88. № 11. С. 1423–1432.
- Хворостова В., Калашникова Е.В., Черкасова О.П. и др. Особенности экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора у гипертензивных крыс линии НИСАГ // Российск. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2003. Т. 89. № 12. С. 1523–1528.
- Шмерлинг М.Д., Филюшина Е.Е., Лазарев В.А. и др. Ультратруктурные особенности почечных телец у крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией // Морфология. 2001. Т. 120. № 6. С. 70–74.
- Acuna-Castillo C., Aravena M., Leiva-Salcedo E. *et al.* T-kininogen, a cystatin-like molecule, inhibits ERK-dependent lymphocyte proliferation // Mech. Ageing Dev. 2005. V. 126. No. 12. P. 1284–1291.
- Almeida F.A., Stella R.C., Voos A. *et al.* Malignant hypertension: a syndrome associated with low plasma kininogen and kinin potentiating factor // Hypertension. 1981. V. 3. No. 6. Pt. 2. P. II-46–49.
- Androulakis E., Tousoulis D. *et al.* Inflammation in hypertension: current therapeutic approaches // Curr. Pharm. Des. 2011. V. 17. No. 37. P. 4121–4131.

- Aravena M., Pérez C., Pérez V. *et al.* T-kininogen can either induce or inhibit proliferation in Balb/c 3T3 fibroblasts, depending on the route of administration // *Mech. Ageing Dev.* 2005. V. 126. No. 3. P. 399–406.
- Bareyre F.M., Schwab M.E. Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays // *Trends Neurosci.* 2003. V. 26. No. 10. P. 555–563.
- Bönnner G., Preis S., Schunk U. *et al.* Hemodynamic effects of bradykinin on systemic and pulmonary circulation in healthy and hypertensive humans // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1990. V. 15. Suppl. 6. P. S46–56.
- Castro M.M., Rizzi E., Prado C. *et al.* Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling // *Matrix Biol.* 2010. V. 29. No. 3. P. 194–201.
- Chao J., Chao L. Kallikrein-kinin in stroke, cardiovascular and renal disease // *Exp. Physiol.* 2005. V. 90. No. 3. P. 291–298.
- Chao J., Zhang J.J., Lin K.F., Chao L. Adenovirus-mediated kallikrein gene delivery reverses salt-induced renal injury in Dahl salt-sensitive rats // *Kidney Int.* 1998. V. 54. No. 4. P. 1250–1260.
- Chiu J.J., Usami S., Chien S. Vascular endothelial responses to altered shear stress: pathologic implications for atherosclerosis // *Ann. Med.* 2009. V. 41. No. 1. P. 19–28.
- Cowley A.W. Long-term control of arterial blood pressure // *Physiol. Rev.* 1992. V. 72. No. 1. P. 231–300.
- Dunning M.J., Smith M.L., Ritchie M.E., Tavaré S. beadarray: R classes and methods for Illumina bead-based data // *Bioinformatics.* 2007. V. 23. No. 16. P. 2183–2184.
- Ekstrand J., Razuvaev A. *et al.* Tissue factor pathway inhibitor-2 is induced by fluid shear stress in vascular smooth muscle cells and affects cell proliferation and survival // *J. Vasc. Surg.* 2010. V. 52. No. 1. P. 167–175.
- Garrett M., Joe B. *et al.* Identification of blood pressure quantitative trait loci that differentiate two hypertensive strains // *J. Hypert.* 2002. V. 20. No. 12. P. 2399–2406.
- Ghiadoni L., Taddei S., Virdis A. Hypertension and endothelial dysfunction: therapeutic approach // *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2012. V. 10. No. 1. P. 42–60.
- Guyton A.C. Long-term arterial pressure control: an analysis from animal experiments and computer and graphic models // *Am. J. Physiol.* 1990. V. 259. No. 5. Pt 2. P. R865–877.
- Havlik R. *et al.* Blood pressure aggregation in families // *Am. J. Epidemiol.* 1979. V. 110. No. 3. P. 304–312.
- Hirschhorn J.N. Genetic approaches to studying common diseases and complex traits // *Pediatr. Res.* 2005. V. 57. No. 5. Pt. 2. P. 74R–77R.
- Hopcroft L.E., McBride M.W., Harris K.J. *et al.* Predictive response-relevant clustering of expression data provides insights into disease processes // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. No. 20. P. 6831–6840.
- Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists // *Nucleic Acids Res.* 2009a. V. 37. No. 1. P. 1–13.
- Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources // *Nat. Protoc.* 2009b. V. 4. No. 1. P. 44–57.
- Iwai N., Yasui N., Naraba H. *et al.* Klk1 as one of the genes contributing to hypertension in Dahl salt-sensitive rat // *Hypertension.* 2005. V. 45. No. 5. P. 947–953.
- Korstanje R., DiPetrillo K. Unraveling the genetics of chronic kidney disease using animal models // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2004. V. 287. No. 3. P. F347–352.
- Levy D., DeStefano A.L., Larson M.G. *et al.* Evidence for a gene influencing blood pressure on chromosome 17. Genome scan linkage results for longitudinal blood pressure phenotypes in subjects from the framingham heart study // *Hypertension.* 2000. V. 36. No. 4. P. 477–483.
- Levy D., Ehret G.B., Rice K. *et al.* Genome-wide association study of blood pressure and hypertension // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. No. 6. P. 677–687.
- Lifton R.P., Gharavi A.G., Geller D.S. Molecular mechanisms of human hypertension // *Cell.* 2001. V. 104. No. 4. P. 545–556.
- Lynn K., Li L., Lin Y. *et al.* A neural network model for constructing endophenotypes of common complex diseases: an application to male young-onset hypertension microarray data // *Bioinformatics.* 2009. V. 25. No. 8. P. 981–988.
- Makhanova N.A., Crowley S.D., Griffiths R.C., Coffman T.M. Gene expression profiles linked to AT1 angiotensin receptors in the kidney // *Physiol. Genomics.* 2010. V. 42A. No. 3. P. 211–218.
- Markel A.L. Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension // *Genetic hypertension. Paris: Colloque INSERM*, 1992. V. 218. P. 405–407.
- Markel A.L., Maslova L.N., Shishkina G.T. *et al.* Developmental influences on blood pressure regulation in ISIAH rats // *Development of the hypertensive phenotype: basic and clinical studies.* Amsterdam; Lausanne; New York; Oxford; Shannon; Singapore; Tokyo: Elsevier, 1999. V. 19. P. 493–526.
- Markel A.L., Redina O.E., Gilinsky M.A. *et al.* Neuroendocrine profiling in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension // *J. Endocrinol.* 2007. V. 195. No. 3. P. 439–450.
- Melk A., Mansfield E.S., Hsieh S.C. *et al.* Transcriptional analysis of the molecular basis of human kidney aging using cDNA microarray profiling // *Kidney Int.* 2005. V. 68. No. 6. P. 2667–2679.
- Moreno C., Dumas P., Kaldunski M. *et al.* Genomic map of cardiovascular phenotypes of hypertension in female Dahl S rats // *Physiol. Genomics.* 2003. V. 15. No. 3. P. 243–257.
- Mukherjee S., Belbin T., Spray D. *et al.* Microarray technology in the investigation of diseases of myocardium with special reference to infection // *Front Biosci.* 2006. V. 11. P. 1802–1813.
- Mullins L.J., Bailey M.A., Mullins J.J. Hypertension, kidney, and transgenics: a fresh perspective // *Physiol. Rev.* 2006. V. 86. No. 2. P. 709–746.
- Newton-Cheh C., Johnson T., Gateva V. *et al.* Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. No. 6. P. 666–676.

- Park S.K., Prolla T.A. Gene expression profiling studies of aging in cardiac and skeletal muscles // *Cardiovasc. Res.* 2005. V. 66. No. 2. P. 205–212.
- Pérez V., Leiva-Salcedo E. *et al.* T-kininogen induces endothelial cell proliferation // *Mech. Ageing Dev.* 2006. V. 127. No. 3. P. 282–289.
- Rapoport R.M., Draznin M.B., Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation // *Nature.* 1983. V. 306. No. 5939. P. 174–176.
- Redina O.E., Smolenskaya S.E., Abramova T.O. *et al.* Differential transcriptional activity of kidney genes in hypertensive ISIAH and normotensive WAG rats // *Clinical Experimental Hypertension.* 2014. DOI: 10.3109/10641963.2014.954711.
- Schork N.J., Krieger J., Trolliet M. *et al.* A biometrical genome search in rats reveals the multigenic basis of blood pressure variation // *Genome Res.* 1995. V. 5. No. 2. P. 164–172.
- Smyth G.K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments // *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 2004. V. 3. No. 1. P. Article 3.
- Touyz R.M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? // *Hypertension.* 2004. V. 44. No. 3. P. 248–252.
- Uehara Y., Hirawa N., Numabe A. *et al.* Long-term infusion of kallikrein attenuates renal injury in Dahl salt-sensitive rats // *Am. J. Hypertens.* 1997. V. 10. No. 5. Pt. 2. P. 83S–88S.
- Viemann D., Schulze-Osthoff K., Roth J. Potentials and pitfalls of DNA array analysis of the endothelial stress response // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. V. 1746. No. 2. P. 73–84.
- Wang C., Chao L., Chao J. Direct gene delivery of human tissue kallikrein reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats // *J. Clin. Invest.* 1995. V. 95. No. 4. P. 1710–1716.
- Wang Y., O'Connell J.R., McArdle P.F. *et al.* From the Cover: Whole-genome association study identifies STK39 as a hypertension susceptibility gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. No. 1. P. 226–231.
- Yuan B., Liang M., Yang Z. *et al.* Gene expression reveals vulnerability to oxidative stress and interstitial fibrosis of renal outer medulla to nonhypertensive elevations of ANG II // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003. V. 284. No. 5. P. R1219–1230.

THE DOWNREGULATION OF GENES CONTROLLING VASCULAR TONE IN KIDNEYS OF ISIAH RATS WITH STRESS-INDUCED ARTERIAL HYPERTENSION

O.E. Redina¹, L.O. Klimov¹, N.I. Ershov¹, T.O. Abramova¹, L.N. Ivanova^{1,2}, A.L. Markel^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: oredina@ngs.ru;

² Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

Summary

The transcriptional activity of genes was studied in kidneys of hypertensive ISIAH and normotensive WAG rats in order to detect genes significantly expressed in kidneys of just one of the analyzed strains. Gene profiling was performed on the Illumina RatRef-12 Expression BeadChip microarray platform. The expression of three genes (*Klk1*, *Klk1c10*, and *Knk1*) related to the kallikrein-kinin system was significant in the WAG renal cortex but was not detected in hypertensive kidneys. The downregulation of these three genes and *Gucyl3* in ISIAH renal cortex suggests the weakened function of the kallikrein-kinin system in hypertensive kidneys, which may cause blood circulation disturbances in renal glomeruli and mediate the development of hypertension in ISIAH rats. The functional annotation of the genes significantly expressed in renal medulla of just one of the compared rat strains revealed the genes involved in immune response regulation.

Key words: ISIAH rats, transcriptional activity of genes, microarrays, stress-induced arterial hypertension, emotional stress.