

©Коллектив авторов

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ПОЧЕЧНОЙ ТКАНИ НОРМОТЕНЗИВНЫХ И ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС

О.А. Бунеева*, В.И. Федченко, С.А. Калошина, М.Г. Завьялова, В.Г. Згода, А.Е. Медведев

Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; *эл. почта: olbuneeva@gmail.com

Сравнительный протеомный анализ почечной ткани нормотензивных (WKY) и гипертензивных (SHR) крыс выявил количественные и качественные изменения ряда белков. Специфичные для животных линии WKY (артериальное давление 110–120 мм рт. ст.) белки почек варьировали в диапазоне 13–16, специфичные для SHR (артериальное давление 180 мм рт. ст. и более) — в диапазоне 24–28, а общее число идентифицированных для обеих линий белков составило 972–975. При попарном сравнении всех возможных (SHR-WKY) вариантов идентифицированы 8 белков, специфичных только для нормотензивных животных, и 7 — только для гипертензивных. С учётом их биологической роли, отсутствие одних белков-ферментов у крыс-гипертоников (например, биливердинредуктаза А) снижает выработку молекул, проявляющих гипотензивные свойства, а появление других (бетаин-гомоцистеин S-метилтрансфераза 2, септин 2 и др.) может быть интерпретировано как компенсаторная реакция. На долю белков, относительное содержание которых менялось в почках не менее 2,5 раз, пришлось не более 5% всех идентифицированных белков. Среди белков, относительное содержание которых увеличивалось у гипертонических животных, наибольшую группу составляли белки, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена, а также антиоксидантные и защитные белки. В контексте развития гипертонии выявленные изменения, по-видимому, могут рассматриваться как компенсаторные. Среди белков, относительное содержание которых у крыс-гипертоников снизилось наиболее сильно, драматическое снижение ацил-КоА-синтетазы среднепочечных жирных кислот (ACSM3), по-видимому, вносит важный вклад в развитие почечной патологии у этих животных.

Ключевые слова: артериальная гипертония; крысы WKY и SHR; протеомное профилирование ткани почек

DOI: 10.18097/PBMC20247002089

ВВЕДЕНИЕ

Крысы со спонтанной гипертонией (SHR) служат удобной моделью, воспроизводящей основные черты, присущие эссенциальной гипертонии у человека [1]. Повышение давления у этих животных начинается с возраста 6–7 недель, достигая уровня стабильной гипертонии к 17–19 неделе [1]. По аналогии с гипертонией у человека развитие гипертонии у SHR сопровождается повреждением почек, схожим с нефропатиями у пациентов гипертоников [2–4]. Предрасположенность SHR к гипертонической болезни почек связывают как с конкретными [4], так и с множественными независимыми локусами генома [5]. Хотя сопоставление относительного содержания почечных белков у животных SHR и контрольной линии крыс (Wistar Kyoto; WKY), на базе которых и была создана линия SHR, было выполнено в ряде работ [6, 7], роль дифференциально экспрессирующихся белков в развитии почечной патологии остается недостаточно изученной [6].

В связи с этим целью настоящего исследования был протеомный анализ почек у животных SHR (с уровнем артериального давления 180 мм рт. ст.) и нормотензивных крыс WKY.

МЕТОДИКА

Реактивы

В работе использовали следующие реактивы: гидрокарбонат аммония, дитиотреитол, мочевины,

гуанидин гидрохлорид, тритон X-100, хлористый натрий, 4-винилпиридин, Кумасси бриллиантовый синий G-250 (“Merck”, США); муравьиную кислоту, едкий натр (“Acros Organics”, США), ацетонитрил (“Fisher Chemical”, Великобритания); изопропанол, трифторуксусную кислоту (“Fluka”, США); трис-(2-карбоксиэтил)-фосфин (“Pierce”, США); модифицированный трипсин (mass spectrometry grade, “Promega”, США). Остальные реактивы были отечественного производства максимальной доступной чистоты.

Экспериментальные животные

В экспериментах использовали 14-недельных крыс-самцов линии WKY (n=6; артериальное давление 110–120 мм рт. ст.) и SHR (n=5; артериальное давление 180 мм рт. ст. и более), полученных из питомника лабораторных животных Пушино (филиал Института биорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Животных декапитировали под лёгким эфирным наркозом, быстро удаляли почки, которые немедленно замораживали и хранили до исследования при температуре -70°C.

Получение лизатов гомогенатов почек

Ткань почек гомогенизировали при помощи гомогенизатора Heidolph SilentCrusher (50000 об/мин) в 0,05 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4) до конечной концентрации 30 мг/мл. Для оценки относительных количественных изменений содержания

белков при подготовке проб использовали одинаковое количество общего белка, которое контролировали с помощью метода Бредфорда [8]. После инкубации в присутствии 3% Тритона X-100 (4°C, 1 ч) лизаты разводили в 3 раза тем же буфером и центрифугировали 30 мин при 16000 g для получения осветлённой надосадочной жидкости.

Подготовку проб для масс-спектрометрического анализа (экстракцию белков, алкилирование и трипсинолиз) осуществляли, как описано ранее [9].

Масс-спектрометрический анализ и статистическая обработка данных

Условия масс-спектрометрического анализа подробно приведены в [10]. Белки были идентифицированы по 2 и более пептидам, аминокислотная последовательность каждого из которых была расшифрована, исходя из тандемного масс-спектра, и регистрировались минимум в двух из трёх технических повторов.

Для выявления различий в распределении белков в пробах применяли статистический анализ проб по величинам LFQ (Label Free Quantitation) идентифицированных белков. Определение белков, статистически достоверных значимо различающихся между образцами, проводили с использованием Volcano plot в приложении Perseus по значениям $\text{Log}_2(\text{LFQ})$ с параметрами отсечения $\text{FDR} = 0,05$ и $S_0 = 1$ (различие в содержании LFQ более двух раз). С использованием Volcano диаграммы на основе t -критерия были выявлены белки, интенсивности сигналов пептидов которых достоверно отличались между пробами (в Дополнительных материалах приведены наиболее достоверные белки с различием в содержании LFQ более двух раз и $(-\text{Log } P) > 1,3$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При попарном сравнении проб были построены диаграммы Венна, иллюстрирующие сходство и различия белкового состава сравниваемых образцов. На рисунке 1 приведена такая диаграмма для одной из пар образцов. В остальных случаях были получены практически идентичные результаты: специфичные для животных линии WKY белки варьировали в диапазоне 13–16, специфичные для SHR — 24–28, общие для обеих линий белки — 972–975.

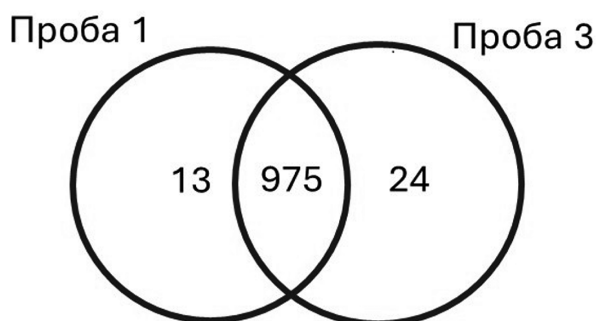


Рисунок 1. Распределение идентификаций белков между пробами 1-3 (контрольные и гипертонические крысы).

В результате проведённых сравнений были выявлены 8 белков, встречающихся в случае всех сравниваемых пар образцов исключительно в почках контрольных крыс (рис. 2, табл. 1). Для половины из этих белков в литературе имеются данные об их связи с гипертензией и/или почечной недостаточностью. К ним относятся фосфопируватгидратаза [11], Ras-родственный белок Rab-11A [12], белок суперсемейства кинезинов [13], биливердинредуктаза A [14]. В контексте развития гипертонии особенно интересна биливердинредуктаза A (BVRA). Этот фермент (КФ 1.3.1.24) катализирует реакцию восстановления биливердина в билирубин, который снижает артериальное давление, улучшает почечный кровоток и действует в качестве селективного лиганда PPAR α рецепторов, способствующих снижению артериального давления [14]. Мыши, лишённые гена, кодирующего этот фермент, характеризуются 100-кратным снижением уровня билирубина в крови и повышением показателей, характеризующих эндогенный оксидативный стресс [15]. В связи с этим отсутствие детектируемых количеств BVRA у SHR, очевидно, вносит свой вклад в развитие гипертонии.

Из 7 белков, встречающихся (по результатам четырёх экспериментов) исключительно в почках крыс-гипертоников (рис. 3, табл. 1), все ассоциированы с развитием сердечно-сосудистой патологии. К их числу относятся ответственный за выведение токсинов и лекарств белок (multidrug and toxin extrusion protein 1) [15], префолдин (субъединица 5) [16, 17], коатомер (дельта-субъединица) [18], убиквитинконъюгирующий фермент E2 V2 [19], септин-2 [20, 21], проминин 1 [22, 23] и бетаин-гомоцистеин S-метилтрансфераза 2 (BHMT2) [24, 25]. Например, фермент бетаин-гомоцистеин S-метилтрансфераза (КФ 2.1.1.5) катализирует реакцию реметилирования гомоцистеина до метионина с использованием бетаина в качестве донора метильной группы. С учётом известных данных об ассоциации гомоцистеина с уровнем артериального давления [24, 26], а также о снижении уровня бетаина плазмы у находящихся на диализе пациентов-гипертоников [26], детекция BHMT2 именно в почках крыс-гипертоников свидетельствует о важной роли этого фермента в развитии гипертонии. Septin-2 — представитель высоко консервативного семейства GTPаз цитоскелета — ослабляет ряд эффектов ангиотензина II на клетки [27].

Помимо качественных различий, в протеомах почек нормотензивных (WKY) и гипертензивных (SHR) крыс были обнаружены достоверные изменения относительного содержания белков в почках животных линии SHR по сравнению с крысами контрольной группы (WKY). На рисунке 4 в качестве примера приведена Volcano диаграмма сравнения белков проб 1–3, а в таблицах 2 и 3 указаны белки, содержание которых увеличивается (табл. 2) и уменьшается (табл. 3) в почках гипертонических крыс по сравнению с контрольными животными. В таблицах 2 и 3 приведены белки, изменение относительного содержания которых наиболее выражено и показано не менее чем для двух пар

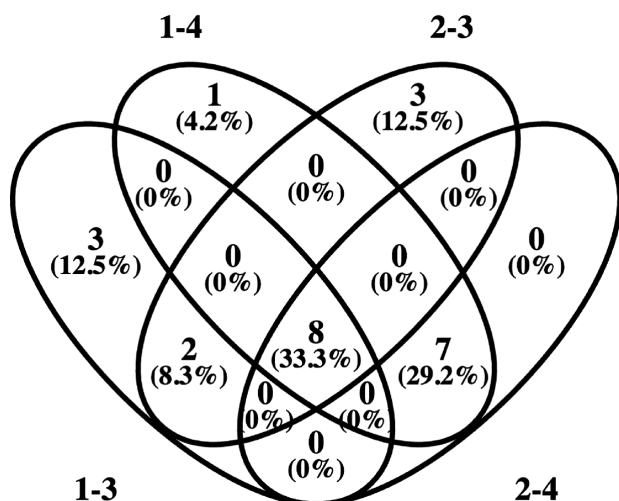


Рисунок 2. Диаграмма Венна. Белки, встречающиеся исключительно в почках контрольных крыс (данные четырёх экспериментов).

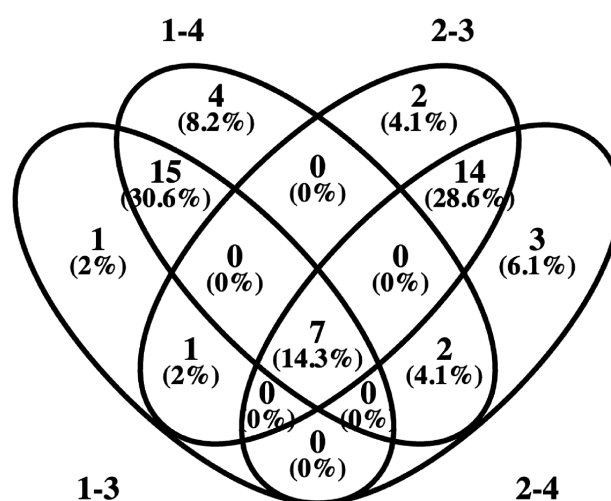


Рисунок 3. Диаграмма Венна. Белки, встречающиеся исключительно в почках гипертонических крыс (данные четырёх экспериментов).

Таблица 1. Протеомная идентификация белков почек, эксклюзивных для контрольных и для гипертонических крыс (по результатам четырёх опытов)

№	Номер в базе Uniprot	Ген по Uniprot	Название белка по Uniprot	Функции	Локализация	Роль при сердечно-сосудистой патологии
Исключительно в контроле						
1	A0A8I5ZMA1	<i>Eno2</i>	Phosphopyruvate hydratase	1	C	[11]
2	A0A8I6AA65	<i>Rab11a</i>	Ras-related protein Rab-11A	2	PM, Ve, G, M	[12]
3	A0A8L2QCP8	<i>Kif5b</i>	Kinesin-like protein	2	Ve, Mch, Microtub	[13]
4	A0A142BM04	<i>unreviewed</i>	Anti-F4/80 kappa light chain variable region	4	C	—
5	A0JN30	<i>Cnpy2</i>	Canopy FGF signaling regulator 2	3	ER	—
6	D3ZRN3	<i>Actb2</i>	Actin, beta-like 2	2	C	—
7	Q6AZ33	<i>Blvra</i>	Biliverdin reductase A	3	C	[14]
8	Q9JJI4	<i>Mup4l1</i>	Alpha-2u globulin	3	Mch, S	—
Исключительно при гипертонии						
1	A0A8I5ZRP9	<i>Slc47a1</i>	Multidrug and toxin extrusion protein 1	2	M	[15]
2	A0A8I5Y1V4	<i>Pfdn5</i>	Prefoldin subunit 5	4	C	[16, 17]
3	A0A8I5ZSE6	<i>Arcn1</i>	Coatomer subunit delta	2	C, M, G, Ve	[18]
4	A0A0G2JU07	<i>Ube2v2</i>	Ubiquitin conjugating enzyme E2 V2	6	N, C	[19]
5	A0A8L2QCZ9	<i>Septin2</i>	Septin-2	2	C, M	[20, 21]
6	A0A8I6GLV7	<i>Prom1</i>	Prominin 1	3	M	[22, 23]
7	F1LMG2	<i>Bhmt2</i>	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 2	6	N, C	[24, 25]

Примечание. Здесь и в остальных таблицах цифры в колонке “функции” обозначают следующие функциональные группы белков: 1. Белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена. 2. Белки, участвующие в образовании цитоскелета, транспорте и экзоцитозе. 3. Белки, участвующие в передаче сигнала и регуляции активности ферментов. 4. Антиоксидантные и защитные белки/ферменты. 5. Белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки. 6. Ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений. 7. Ферменты, участвующие в метаболизме липидов. Локализация белков: C – цитоплазма, N – ядро, M – мембраны, PM – плазматическая мембрана, Mch – митохондрии, ER – эндоплазматический ретикулум, G – комплекс Гольджи, L – лизосомы, Microtub – микротрубочки, Ve – везикулы, Per – пероксисомы, S – секретируемые белки, Extra – внеклеточное пространство.

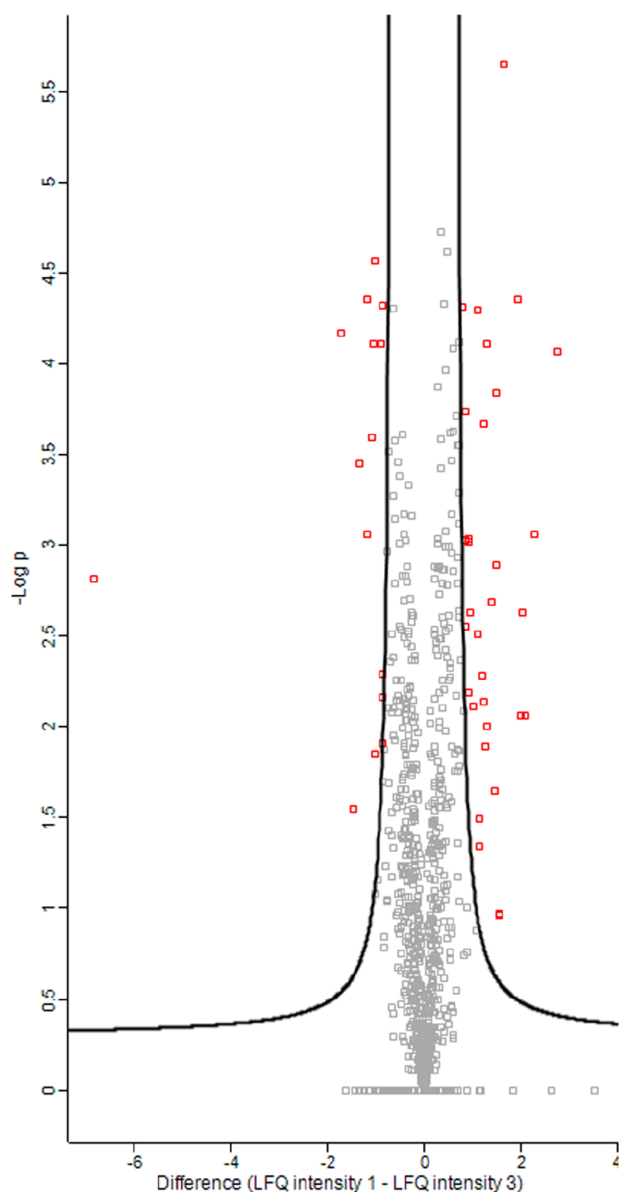


Рисунок 4. Volcano диаграмма сравнения белков проб 1-3. Ось x – диапазон различия $\log_2(\text{LFQ})$, ось y – статистическая значимость, красный – белки со статистически значимыми отличиями, серый – белки со статистически незначимыми отличиями. Точки в области отрицательных значений принадлежат белкам, интенсивность сигнала пептидов которых выше в пробе 3. Точки в области положительных значений принадлежат белкам, интенсивность сигнала пептидов которых выше в пробе 1. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии статьи.

экспериментов. Все достоверные результаты изменения относительного содержания белков в почках крыс линии SHR по сравнению с контрольными животными даны в Дополнительных материалах в таблицах S1–S8.

Как видно из данных таблиц 2 и 4, среди белков, относительное содержание которых увеличивалось у гипертонических животных, наибольшую группу составляли белки, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена. Это цитохром *c*-оксидаза, субъединицы NADH-дегидрогеназного комплекса, АТФ-синтазы,

а также дигидролипоилдегидрогеназа — компонент мультиферментных митохондриальных комплексов дегидрогеназ кетокислот (табл. 2, рис. 5). У животных SHR относительное содержание большинства этих белков возрастало в 6–8 раз по сравнению с крысами контрольной линии. Это согласуется с данными об увеличении выработки АТФ в митохондриях клеток проксимальных канальцев почек SHR по сравнению с WKY [37]. Примечательно, что в контексте повышения активности пируватдегидрогеназного комплекса (ПДГ) почек крыс-гипертоников [37], в наших экспериментах обнаружено увеличение относительного содержания не только дигидролипоилдегидрогеназы (компонент Е3 ПДГ), но и белка-переносчика пирувата через внутреннюю мембрану митохондрий (табл. 2, рис. 5).

Также у гипертонических крыс по сравнению с контрольными значительно повышалось относительное содержание антиоксидантных и защитных белков. Так, почти в 7 раз возрастало содержание супероксиддисмутазы, в 4 раза — глутатион S-трансферазы (табл. 2, рис. 5). В литературе есть сведения, что изменение активности обоих этих ферментов коррелирует с развитием гипертензии [28, 31]. Сильно повышено (почти в 15 раз) у животных SHR было содержание лёгкой каппа цепи иммуноглобулина (табл. 2, рис. 5).

У гипертонических животных по сравнению с контрольными более чем в 7 раз было увеличено относительное содержание калмодулина, что согласуется с ранее опубликованным данным о повышении активности этого регуляторного белка в почках и сердце крыс и мышей линии SHR [35].

Наибольшее изменение относительного содержания (почти в 18 раз) у крыс линии SHR было нами отмечено для коллагена VI типа. Этот белок — основной компонент базальной мембраны; в литературе описана специфическая нефропатия у пациентов с гипертензией и отложением этого белка в почечных клубочках [29].

Снижение относительного содержания у гипертонических животных в два и более раз наблюдалось нами для белков, относящихся к различным функциональным группам (табл. 3, 4, рис. 6). В подавляющем большинстве случаев для этих белков подтверждена роль в развитии сердечно-сосудистой патологии [33, 38–53]. Наиболее выражено в почках крыс линии SHR уменьшение относительного содержания митохондриальной ацил-КоА-синтазы среднецепочечных жирных кислот (ACSM3, 0,007 против 1 в контроле, то есть уменьшение более чем в 140 раз) (табл. 3, рис. 6). Нокаут этого фермента у мышей сопровождается нарушением метаболизма глюкозы и липидов, митохондриальной дисфункцией со снижением образования АТФ и увеличением активных форм кислорода [54]. С учётом этих данных есть все основания полагать, что драматическое снижение ACSM3 способствует развитию метаболического синдрома, который, в свою очередь, провоцирует дальнейшее развитие почечной патологии [55].

Таблица 2. Протеомная идентификация увеличения относительного содержания белков почек у гипертонических крыс по сравнению с контрольными животными по результатам четырёх опытов. Указаны наиболее выраженные изменения относительного содержания белков

№	Номер в базе Uniprot	Ген по Uniprot	Название белка по Uniprot	Функции	Локализация	-LOG(P-значение)	Кратность изменения	Роль при сердечно-сосудистой патологии
1	P01835	<i>IGKC</i>	Ig kappa chain C region, B allele	4	C	2,108	14,777	—
2	G3V983	<i>Gstm1</i>	Glutathione S-transferase	4	C, Mch, ER, N, PM	3,688	4,181	[28]
3	F1LQM1	<i>Mup4l1</i>	Alpha-2u-globulin (L type)	3	S	4,546	7,095	—
4	A0A8I5ZTR6	<i>Col6a3</i>	Collagen type VI alpha 3 chain	2	S	3,150	17,816	[29]
5	Q6PDV1	<i>Lyz2</i>	Lysozyme	6	C	4,358	3,846	[30]
6	B5DEL8	<i>Ndufs5</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5	1	Mch, M	2,940	3,379	—
7	Q6LDS4	<i>Sod1</i>	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	4	Mch, L	6,249	6,879	[31]
8	P12075	<i>Cox5b</i>	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	1	Mch	2,752	8,146	[32]
9	P38718	<i>Mpc2</i>	Mitochondrial pyruvate carrier 2	2	Mch	2,126	7,222	[33]
10	G3V7Y3	<i>Atp5f1d</i>	ATP synthase F1 subunit delta	1	Mch	2,741	5,788	[34]
11	A0A8I5ZR70	<i>Rdx</i>	Radixin	2	PM, C, M	3,592	4,508	—
12	P25093	<i>Fah</i>	Fumarylacetoacetase	6	C	1,318	3,651	—
13	A0A8I6AN99	<i>Ubb-ps1</i>	Ubiquitin B, pseudogene 1	6	C, N	3,153	3,008	—
14	Q5RJN0	<i>Ndufs7</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial	1	Mch	3,415	4,395	—
15	P0DP31	<i>Calm3</i>	Calmodulin-3	3	C	2,299	7,432	[35]
16	A0A8I5ZTF9	<i>Akr1b1</i>	Aldo-keto reductase family 1 member B1	7	C	4,428	4,815	—
17	B2RZC1	<i>Rbp4</i>	Retinol-binding protein	2	S	3,032	3,379	—
18	A0A8I5ZXS2	<i>Dld</i>	Dihydrolipoyl dehydrogenase	1	Mch, Ve	3,551	3,010	—
19	P27139	<i>Ca2</i>	Carbonic anhydrase 2	3	C, PM	4,595	2,867	[36]
20	P20760	<i>Igg-2a</i>	Ig gamma-2A chain C region	4	PM	4,614	4,316	—
21	P11030	<i>Dbi</i>	Acyl-CoA-binding protein	7	ER, G	1,579	3,620	—

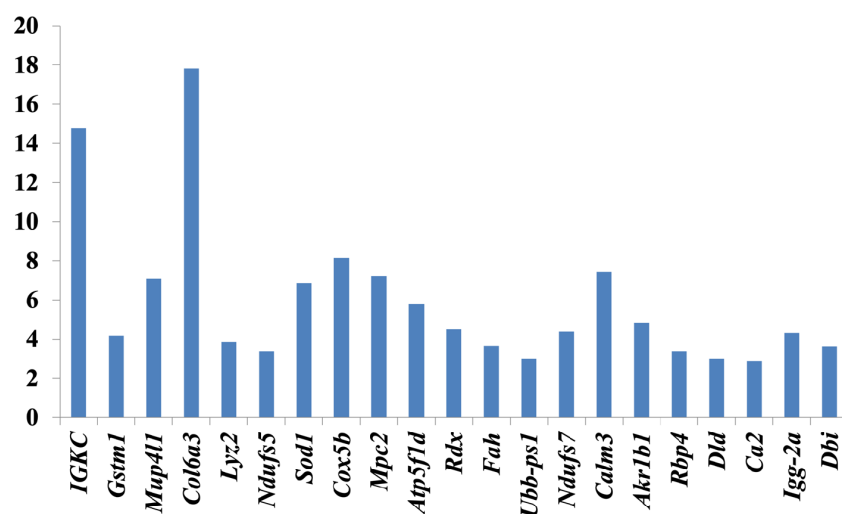


Рисунок 5. Белки почек гипертонических крыс, относительное содержание которых увеличивается по сравнению с контрольными животными (обозначены гены белков, изменение относительного содержания которых наиболее выражено).

ПРОТЕОМ ПОЧЕК НОРМОТЕНЗИВНЫХ И ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС

Таблица 3. Протеомная идентификация уменьшения относительного содержания белков почек у гипертонических крыс по сравнению с контрольными животными по результатам четырёх опытов. Указаны наиболее выраженные изменения относительного содержания белков

№	Номер в базе Uniprot	Ген по Uniprot	Название белка по Uniprot	Функции	Локализация	-LOG(P-значение)	Кратность изменения	Роль при сердечно-сосудистой патологии
1	Q9WVK3	<i>Pecr</i>	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	7	Per	4,372	0,289	—
2	Q6SKG1	<i>Acsm3</i>	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3, mitochondrial	7	Mch	2,896	0,007	[38]
3	Q91ZW6	<i>Tmlhe</i>	Trimethyllysine dioxygenase, mitochondrial	6	Mch	3,879	0,294	[39]
4	P07171	<i>Calb1</i>	Calbindin	3	C, N, S	4,868	0,414	[40, 41]
5	A0A8I6A174	<i>Ywhah</i>	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta	3	C	3,447	0,394	—
6	D4A1D8	<i>Surf4</i>	Surfeit locus protein 4	2	ER, G, M	2,363	0,296	—
7	A0A8I5ZLR0	<i>Gstt3</i>	Glutathione transferase	4	C, Mch, ER, N, PM	4,597	0,420	[42, 43]
8	A0A8L2UH84	<i>Pebp1</i>	Phosphatidylethanolamine binding protein 1	3	C	4,114	0,483	—
9	A0A8I6A9U0	<i>Fgb</i>	Fibrinogen beta chain	3	S	2,934	0,408	—
10	Q562C3	<i>Gcat</i>	Glycine C-acetyltransferase (2-amino-3-ketobutyrate-coenzyme A ligase)	6	Mch, N	2,240	0,483	[44, 45]
11	A0A8I6AH82	<i>Xylb</i>	Xylulose kinase	1		2,691	0,481	[46]
12	D4A4D5	<i>Rplp2</i>	Large ribosomal subunit protein P2	5	C	2,480	0,325	—
13	P85971	<i>Pgls</i>	6-phosphogluconolactonase	1	C	2,326	0,399	[47]
14	A0A0G2JUM0	<i>Sult1c2</i>	Sulfotransferase	4	C, L	2,983	0,471	[48, 49]
15	D4AE56	<i>Ptges2</i>	Prostaglandin E synthase 2	7	M	1,782	0,403	[50]
16	A0A8I6A9B3	<i>Hspa12a</i>	Heat shock protein family A (Hsp70) member 12A	4	C, M, Mch	1,870	0,386	[51]
17	D3ZNJ5	<i>Inmt</i>	Indolethylamine N-methyltransferase	4	C	3,379	0,162	—
18	A0A8L2R5Y9	<i>Arl8b</i>	Small monomeric GTPase	3	C, M	2,096	0,430	[52]
19	A0A8I5ZV58	<i>Aass</i>	Amino adipate-semialdehyde synthase	6	Mch	2,941	0,410	[53]
20	B2RYS0	<i>Cox7a2</i>	Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	1	Mch	3,207	0,228	[32]

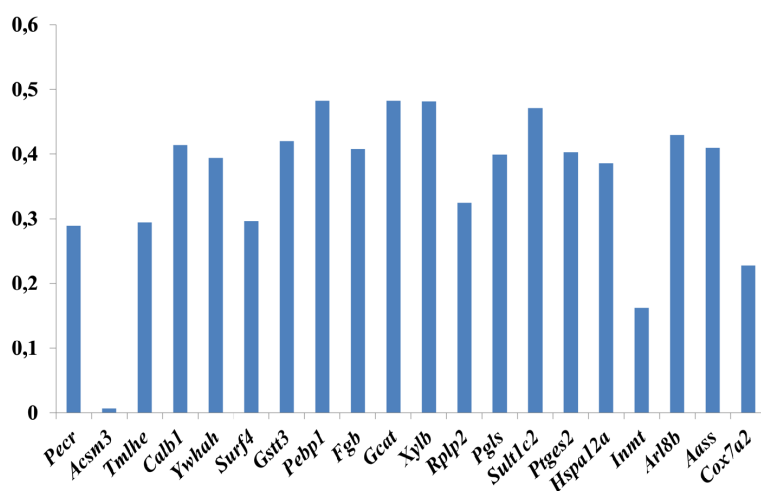


Рисунок 6. Белки почек гипертонических крыс, относительное содержание которых уменьшается по сравнению с контрольными животными (обозначены гены белков, изменение относительного содержания которых наиболее выражено).

Таблица 4. Распределение по функциям белков, относительное содержание которых меняется в почках крыс-гипертоников (SHR) по сравнению с контрольными животными (WKY)

Функции	Увеличение относительного содержания	Уменьшение относительного содержания
1. Белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена	5	3
2. Белки, участвующие в образовании цитоскелета, транспорте и экзоцитозе	4	1
3. Белки, участвующие в передаче сигнала и регуляции активности ферментов	3	5
4. Антиоксидантные и защитные белки/ферменты	4	4
5. Белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки	0	2
6. Ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений	3	3
7. Ферменты, участвующие в метаболизме липидов	2	3
Всего	21	20

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным протеомного профилирования почек нормотензивных крыс WKY и крыс-гипертоников SHR выявлены количественные и качественные изменения ряда белков. Последние включали 8 белков, специфичных для нормотензивных животных, и 7 — для гипертензивных. С учётом их биологической роли, отсутствие одних белков-ферментов у крыс-гипертоников (например, биливердинредуктаза А) снижает выработку молекул, проявляющих гипотензивные свойства, а появление других (бетаин-гомоцистеин S-метилтрансфераза 2, септин 2 и др.) может быть интерпретировано как компенсаторная реакция. На долю белков, относительное содержание которых менялось в почках не менее 2,5 раз, пришлось не более 5% всех идентифицированных белков. Среди белков, относительное содержание которых увеличивалось у гипертонических животных, наибольшую группу составляли белки, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена, а также антиоксидантные и защитные белки. И эти изменения также могут рассматриваться как компенсаторные на развитие гипертонии. Среди белков, относительное содержание которых у крыс-гипертоников снизилось наиболее сильно, драматическое снижение ацил-коА-синтазы среднепочечных жирных кислот (ACSM3), по-видимому, вносит важный вклад в развитие почечной патологии у этих животных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Масс-спектрометрический анализ белков выполнен с использованием оборудования и ресурсов ЦКП “Протеом человека” при ИБМХ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.) (№ 122030100170-5).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили с соблюдением общепринятых норм гуманного отношения к лабораторным животным, в соответствии с Приказом Минздрава РФ №199н от 1 апреля 2016 г. “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики” и директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. Reckelhoff J.F., Iliescu R., Yanes L., Fortepiani L.A. (2006) Models of Hypertension. In: Aging in Handbook of Models for Human Aging (Conn P.M., ed.), pp. 999-1009, Academic Press, London. DOI: 10.1016/B978-012369391-4/50084-9
2. Feld L.G., Cachero S., Liew J.B.V., Zamlauski-Tucker M., Noble B. (1990) Enalapril and renal injury in spontaneously hypertensive rats. Hypertension, **16**, 544-554. DOI: 10.1161/01.hyp.16.5.544
3. Griffin K.A. (2017) Hypertensive kidney injury and the progression of chronic kidney disease. Hypertension, **70**, 687-694. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.08314
4. Dhande I.S., Cranford S.M., Zhu Y., Kneeder S.C., Hicks M.J., Wenderfer S.E., Braun M.C., Doris P.A. (2018) Susceptibility to hypertensive renal disease in the spontaneously hypertensive rat is influenced by 2 loci affecting blood pressure and immunoglobulin repertoire. Hypertension, **71**, 700-708. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10593
5. Braun M.C., Herring S.M., Gokul N., Monita M., Bell R., Hicks M.J., Wenderfer S.E., Doris P.A. (2013) Hypertensive renal disease: Susceptibility and resistance in inbred hypertensive rat lines. Hypertension, **31**, 2050-2059. DOI: 10.1097/HJH.0b013e328362f9a5

6. Yu M., Wang X., Du Y., Chen H., Guo X., Xia L., Chen J. (2008) Comparative analysis of renal protein expression in spontaneously hypertensive rat. *Clin. Exp. Hypertens.*, **30**, 315-325. DOI: 10.1080/10641960802269935
7. Sheehan D., Rainville L.-C., Tyther R., McDonagh B. (2012) Redox proteomics in study of kidney-associated hypertension: New insights to old diseases. *Antiox. Redox Signal.*, **17**, 1560-1570. DOI: 10.1089/ars.2012.4705
8. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
9. Бунеева О.А., Капица И.Г., Казиева Л.Ш., Вавилов Н.Э., Згода В.Г., Медведев А.Е. (2023) Количественные изменения изатин-связывающих белков мозга у крыс с индуцированным ротеином экспериментальным паркинсонизмом. *Биомедицинская химия*, **69**(3), 188-192. [Buneeva O.A., Kapitsa I.G., Kazieva L.S., Vavilov N.E., Zgoda V.G., Medvedev A.E. (2023) Quantitative changes of brain isatin-binding proteins of rats with the rotenone-induced experimental parkinsonism. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **69**(3), 188-192.] DOI: 10.18097/PBMC20236903188
10. Капица И.Г., Казиева Л.Ш., Вавилов Н.Э., Згода В.Г., Копылов А.Т., Медведев А.Е., Бунеева О.А. (2023) Особенности поведенческих реакций и профиля изатин-связывающих белков мозга у крыс с индуцированным ротеином экспериментальным паркинсонизмом. *Биомедицинская химия*, **69**(1), 46-54. [Kapitsa I.G., Kazieva L.S., Vavilov N.E., Zgoda V.G., Kopylov A.T., Medvedev A.E., Buneeva O.A. (2023) Characteristics of behavioral reactions and the profile of brain isatin-binding proteins of rats with the rotenone-induced experimental parkinsonism. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **69**(1), 46-54.] DOI: 10.18097/PBMC20236901046
11. Gao L., Xie J., Zhang H., Zheng H., Zheng W., Pang C., Cai Y., Deng B. (2023) Neuron-specific enolase in hypertension patients with acute ischemic stroke and its value forecasting long-term functional outcomes. *BMC Geriatr.*, **23**(1), 294. DOI: 10.1186/s12877-023-03986-z
12. Butterworth M.B., Edinger R.S., Silvis M.R., Gallo L.I., Liang X., Apodaca G., Frizzell R.A., Johnson J.P. (2012) Rab11b regulates the trafficking and recycling of the epithelial sodium channel (ENaC). *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **302**(5), 581-590. DOI: 10.1152/ajprenal.00304.2011
13. Chen Y.L., Zheng L.Q., Li T.J., Sun Z.Q., Hao Y., Wu B.G., Sun Y.X. (2021) Association between rs20456 and rs6930913 of kinesin-like family 6 and hypertension in a Chinese cohort. *Int. J. Hypertens.*, **2021**, 1061800. DOI: 10.1155/2021/1061800
14. Stec D.E., Tiribelli C., Badmus O.O., Hinds T.D. Jr. (2022) Novel function for bilirubin as a metabolic signaling molecule: Implications for kidney diseases. *Kidney360*, **3**(5), 945-953. DOI: 10.34067/KID.0000062022
15. Kawasaki T., Kaneko C., Nakanishi R., Moriyama Y., Nabekura T. (2022) Amiloride is a suitable fluorescent substrate for the study of the drug transporter human multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **592**, 113-118. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.01.014
16. Liang J., Xia L., Oyang L., Lin J., Tan S., Yi P., Han Y., Luo X., Wang H., Tang L., Pan Q., Tian Y., Rao S., Su M., Shi Y., Cao D., Zhou Y., Liao Q. (2020) The functions and mechanisms of prefoldin complex and prefoldin-subunits. *Cell Biosci.*, **10**, 87. DOI: 10.1186/s13578-020-00446-8
17. Chesnel F., Couturier A., Alusse A., Gagné J.P., Poirier G.G., Jean D., Boisvert F.M., Hascoet P., Paillard L., Arlot-Bonnemains Y., le Goff X. (2020) The prefoldin complex stabilizes the von Hippel-Lindau protein against aggregation and degradation. *PLoS Genet.*, **16**(11), 1009183. DOI: 10.1371/journal.pgen.1009183
18. Zhang C., Peng J., Liu Z., Zhou Q. (2023) Kidney involvement in autoimmune diseases. *Kidney Dis. (Basel)*, **9**(3), 157-172. DOI: 10.1159/000529917
19. Yamazaki O., Hirohama D., Ishizawa K., Shibata S. (2020) Role of the ubiquitin proteasome system in the regulation of blood pressure: A review. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(15), 5358. DOI: 10.3390/ijms21155358
20. Moore K., Moore R., Wang C., Norris R.A. (2020) Tugging at the heart strings: The septin cytoskeleton in heart development and disease. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, **7**(1), 3. DOI: 10.3390/jcdd7010003
21. Zhu Y., Zhou J., Li C., Wang Q., Liu X., Ye L. (2018) Regulatory network analysis of hypertension and hypotension microarray data from mouse model. *Clin. Exp. Hypertens.*, **40**(7), 631-636. DOI: 10.1080/10641963.2017.1416120
22. Bhattacharya S., Yin J., Winborn C.S., Zhang Q., Yue J., Chaum E. (2017) Prominin-1 is a novel regulator of autophagy in the human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **58**(4), 2366-2387. DOI: 10.1167/iovs.16-21162
23. Karim B.O., Rhee K.J., Liu G., Yun K., Brant S.R. (2014) Prom1 function in development, intestinal inflammation, and intestinal tumorigenesis. *Front. Oncol.*, **4**, 323. DOI: 10.3389/fonc.2014.00323
24. Wang L., Zhao M., Liu W., Li X., Chu H., Bai Y., Sun Z., Gao C., Zheng L., Yang J. (2018) Association of betaine with blood pressure in dialysis patients. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)*, **20**(2), 388-393. DOI: 10.1111/jch.13190
25. Mogilnicka I., Jaworska K., Koper M., Maksymiuk K., Szudzik M., Radkiewicz M., Chabowski D., Ufnal M. (2024) Hypertensive rats show increased renal excretion and decreased tissue concentrations of glycine betaine, a protective osmolyte with diuretic properties. *PLoS One*, **19**(1), 0294926. DOI: 10.1371/journal.pone.0294926
26. van Guldener C., Nanayakkara P.W.B., Stehouwer C.D.A. (2003) Homocysteine and blood pressure. *Curr. Hypertens. Rep.*, **5**(1), 26-31. DOI: 10.1007/s11906-003-0007-z
27. Guo S.-J., Zhang P., Wu L.-Y., Zhang G.-N., Chen W.-D., Gao P.-J. (2016) Adenovirus-mediated overexpression of septin 2 attenuates α -smooth muscle actin expression and adventitial myofibroblast migration induced by angiotensin II. *J. Vasc. Res.*, **53**(5-6), 309-316. DOI: 10.1159/000452413
28. Nassereddine S., Habbal R., Kassogue Y., Kaltoum A.B.O., Farah K., Majda H., Rhizlane A.E., Nadifi S., Dehbi H. (2021) Analysis of the influence of glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) genes on the risk of essential hypertension. *Ann. Hum. Biol.*, **48**(7-8), 585-589. DOI: 10.1080/03014460.2022.2039291
29. Mori M., Katayama K., Joh K., Ishikawa E., Dohi K. (2022) Type VI collagen-related nephropathy. *Clin. Kidney J.*, **16**(1), 195-196. DOI: 10.1093/ckj/sfac126
30. Paulo N., Baptista P., Nogueira F., Pereira C., Cerqueira A., Rocha A. (2023) Lysozyme-induced nephropathy: A diagnosis not to forget. *Cureus*, **15**(1), 34344. DOI: 10.7759/cureus.34344
31. Yanagisawa H., Kido T., Yogosawa S., Sato O., Sakae K., Suka M. (2015) Inadequate intake of zinc exacerbates blood pressure and renal function via superoxide radical-induced oxidative stress. *Biomedical Research Trace Elements*, **26**(3), 117-123.

32. Palm F., Nordquist L. (2011) Renal oxidative stress, oxygenation, and hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **301**(5), R1229-R1241. DOI: 10.1152/ajpregu.00720.2010
33. Yiew N.K.H., Finck B.N. (2022) The mitochondrial pyruvate carrier at the crossroads of intermediary metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **323**(1), 33-52. DOI: 10.1152/ajpendo.00074.2022
34. Vantourout P., Radojkovic C., Lichtenstein L., Pons V., Champagne E., Martinez L.O. (2010) Ecto-F₁-ATPase: A moonlighting protein complex and an unexpected apoA-I receptor. *World J. Gastroenterol.*, **16**(47), 5925-5935. DOI: 10.3748/wjg.v16.i47.5925
35. Huang S.L., Wen Y.I., Kupranycz D.B., Pang S.C., Schlager G., Hamet P., Tremblay J. (1988) Abnormality of calmodulin activity in hypertension. Evidence of the presence of an activator. *J. Clin. Invest.*, **82**(1), 276-281. DOI: 10.1172/JCI113583
36. Torella D., Ellison G.M., Torella M., Vicinanza C., Aquila I., Iaconetti C., Scalise M., Marino F., Henning B.J., Lewis F.C., Gareri C., Lascar N., Cuda G., Salvatore T., Nappi G., Indolfi C., Torella R., Cozzolino D., Sasso F.C. (2014) Carbonic anhydrase activation is associated with worsened pathological remodeling in human ischemic diabetic cardiomyopathy. *J. Am. Heart Assoc.*, **3**(2), 000434. DOI: 10.1161/JAHA.113.000434
37. Lee H., Abe Y., Lee I., Shrivastav S., Crusan A.P., Hüttemann M., Hopfer U., Felder R.A., Asico L.D., Armando I., Jose P.A., Kopp J.B. (2014) Increased mitochondrial activity in renal proximal tubule cells from young spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int.*, **85**, 561-569. DOI: 10.1038/ki.2013.397
38. Iwai N., Katsuya T., Mannami T., Higaki J., Ogiwara T., Kokame K., Ogata J., Baba S. (2002) Association between SAH, an acyl-CoA synthetase gene, and hypertriglyceridemia, obesity, and hypertension. *Circulation.*, **105**(1), 41-47. DOI: 10.1161/hc0102.101780
39. Li X.S., Wang Z., Cajka T., Buffa J.A., Nemet I., Hurd A.G., Gu X., Skye S.M., Roberts A.B., Wu Y., Li L., Shahan C.J., Wagner M.A., Hartiala J.A., Kerby R.L., Romano K.A., Han Y., Obeid S., Lüscher T.F., Allayee H., Rey F.E., di Donato J.A., Fiehn O., Tang W.H.W., Hazen S.L. (2018) Untargeted metabolomics identifies trimethyllysine, a TMAO-producing nutrient precursor, as a predictor of incident cardiovascular disease risk. *JCI Insight*, **3**(6), 99096. DOI: 10.1172/jci.insight.99096
40. Hemmingsen C. (2000) Regulation of renal calbindin-D28K. *Pharmacol. Toxicol.*, **3**, 5-30.
41. Hemmingsen C., Staun M., Lewin E., Egfford M., Olgaard K. (1994) Calcium metabolic changes and calbindin-D in experimental hypertension. *J. Hypertens.*, **12**(8), 901-907.
42. Delles C., Padmanabhan S., Lee W.K., Miller W.H., McBride M.W., McClure J.D., Brain N.J., Wallace C., Marçano A.C.B., Schmieder R.E., Brown M.J., Caulfield M.J., Munroe P.B., Farrall M., Webster J., Connell J.M., Dominiczak A.F. (2008) Glutathione S-transferase variants and hypertension. *J. Hypertens.*, **26**(7), 1343-1352. DOI: 10.1097/HJH.0b013e3282fe1d67
43. Delles C., McBride M.W., Graham D., Padmanabhan S., Dominiczak A.F. (2010) Genetics of hypertension: From experimental animals to humans. *Biochim. Biophys. Acta*, **1802**(12), 1299-1308. DOI: 10.1016/j.bbdis.2009.12.006
44. El Hafidi M., Pérez I., Baños G. (2006) Is glycine effective against elevated blood pressure? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **9**(1), 26-31. DOI: 10.1097/01.mco.0000196143.72985.9a
45. Wang Z., Zhang J., Wang L., Li W., Chen L., Li J., Zhao D., Zhang H., Guo X. (2018) Glycine mitigates renal oxidative stress by suppressing Nox4 expression in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Pharmacol. Sci.*, **137**(4), 387-394. DOI: 10.1016/j.jphs.2018.08.005
46. Perco P., Ju W., Kerschbaum J., Leierer J., Menon R., Zhu C., Kretzler M., Mayer G., Rudnicki M.; Nephrotic Syndrome Study Network (NEPTUNE) (2019) Identification of dicarbonyl and L-xylulose reductase as a therapeutic target in human chronic kidney disease. *JCI Insight*, **4**(12), 128120. DOI: 10.1172/jci.insight.128120
47. Li Y., Pagano P.J. (2020) Does the mediterranean G6PD S188F polymorphism confer vascular protection? A novel rat model offering CRISPR insight into high fat-induced vascular dysfunction and hypertension. *Hypertension*, **76**(2), 314-315. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14897
48. Rath V.L., Verdugo D., Hemmerich S. (2004) Sulfotransferase structural biology and inhibitor discovery. *Drug Discov. Today*, **9**(23), 1003-1011. DOI: 10.1016/S1359-6446(04)03273-8
49. Singer S.S., Palmert M.R., Redman M.D., Leahy D.M., Feeser T.C., Lucarelli M.J., Volkwein L.S., Bruns M. (1988) Hepatic dopamine sulfotransferases in untreated rats and in rats subjected to endocrine or hypertension-related treatments. *Hepatology*, **8**(6), 1511-1520. DOI: 10.1002/hep.1840080608
50. Nasrallah R., Hassouneh R., Hébert R.L. (2016) PGE₂, kidney disease, and cardiovascular risk: Beyond hypertension and diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **27**(3), 666-676. DOI: 10.1681/ASN.2015050528
51. Rodriguez-Iturbe B., Lanaspa M.A., Johnson R.J. (2019) The role of autoimmune reactivity induced by heat shock protein 70 in the pathogenesis of essential hypertension. *Br. J. Pharmacol.*, **176**(12), 1829-1838. DOI: 10.1111/bph.14334
52. Jeyaraj S.C., Unger N.T., Chotani M.A. (2011) Rap1 GTPases: An emerging role in the cardiovascular system. *Life Sci.*, **88**(15-16), 645-652. DOI: 10.1016/j.lfs.2011.01.023
53. Sacksteder K.A., Biery B.J., Morrell J.C., Goodman B.K., Geisbrecht B.V., Cox R.P., Gould S.J., Geraghty M.T. (2000) Identification of the alpha-aminoadipic semialdehyde synthase gene, which is defective in familial hyperlysinemia. *Am. J. Hum. Genet.*, **66**(6), 1736-1743. DOI: 10.1086/302919
54. Xiao X., Li R., Cui B., Lv C., Zhang Y., Zheng J., Hui R., Wang Y. (2024) Liver ACSM3 deficiency mediates metabolic syndrome via a lauric acid-HNF4α-p38 MAPK axis. *EMBO J.*, **43**(4), 507-532. DOI: 10.1038/s44318-023-00020-1
55. Scurt F.G., Ganz M.J., Herzog C., Bose K., Mertens P.R., Chatzikyrkou C. (2024) Association of metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Obes. Rev.*, **25**(1), e13649. DOI: 10.1111/obr.13649

Поступила в редакцию: 20. 03. 2024.
После доработки: 19. 04. 2024.
Принята к печати: 22. 04. 2024.

COMPARATIVE PROTEOMIC ANALYSIS OF RENAL TISSUE
OF NORMOTENSIVE AND HYPERTENSIVE RATS

O.A. Buneeva, V.I. Fedchenko, S.A. Kaloshina, M.G. Zavyalova, V.G. Zgoda, A.E. Medvedev*

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: olbuneeva@gmail.com

Comparative proteomic analysis of kidney tissue from normotensive (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats revealed quantitative and qualitative changes in renal proteins. The number of renal proteins specific for WKY rats (blood pressure 110–120 mm Hg) was 13–16. There were 20–24 renal proteins specific for SHR (blood pressure 180 mm Hg and more). The total number of identified renal proteins common for both rat strains included 972–975 proteins. A pairwise comparison of all possible (SHR-WKY) variants identified 8 proteins specific only for normotensive (WKY) animals, and 7 proteins specific only for hypertensive ones (SHR). Taking into consideration their biological roles, the lack of some enzyme proteins in hypertensive rats (for example, biliverdin reductase A) reduces the production of molecules exhibiting antihypertensive properties, while the appearance of others (e.g. betaine-homocysteine S-methyltransferase 2, septin 2, etc.) can be interpreted as a compensatory reaction. Renal proteins with altered relative content (with more than 2.5-fold change) accounted for no more than 5% of all identified proteins. Among the proteins with an increased relative content in the hypertensive animals, the largest group consisted of proteins involved in the processes of energy generation and carbohydrate metabolism, as well as antioxidant and protective proteins. In the context of the development of hypertension, the identified relative changes can apparently be considered compensatory. Among the proteins with the most pronounced decrease in the relative content in the hypertensive rats, the dramatic reduction in acyl-CoA medium-chain synthetase-3 (ACSM3) appears to make an important contribution to the development of renal pathology in these animals.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: arterial hypertension; WKY and SHR rats; renal tissue proteomic profiling

Funding. The work was carried out within the framework of the Program of Fundamental Scientific Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100170-5).

Received: 20.03.2024; revised: 19.04.2024; accepted: 22.04.2024.