

УДК 577.218

©Коллектив авторов

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ РЕНИНОВОЙ СИСТЕМЫ ПОЧКИ И СЕРДЦА У ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС ЛИНИИ НИСАГ

Л.А. Федосеева<sup>1\*</sup>, М.А. Рязанова<sup>1</sup>, Е.В. Антонов<sup>1</sup>, Г.М. Дымшиц<sup>1,2</sup>, А.Л. Маркель<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск,  
пр. Лаврентьева, 10; факс: (383)333-12-78, эл. почта: frumgarts@ngs.ru

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Содержание мРНК основных генов ренин-ангиотензиновой системы (РАС) у крыс гипертензивной линии НИСАГ и нормотензивной линии WAG в почке и миокарде определяли методом ПЦР в реальном времени. Показано достоверное снижение уровня мРНК генов РАС в почке у крыс линии НИСАГ: *Ren* – на 45%, *Ace* – на 43%, *AT1A* – на 34%, *COX-2* – на 50%. В миокарде понижен уровень экспрессии *AT1A* на 28% и повышена экспрессия *Ace* – на 80%. Полученные результаты свидетельствуют о снижении базальной активности РАС почки у гипертензивных крыс линии НИСАГ, что позволяет отнести изучаемую линию к группе моделей с низкорениновой формой гипертонии.

У крыс НИСАГ отмечено двукратное повышение концентрации натрия в соединительной ткани, а также небольшое, но достоверное увеличение этого показателя в плазме крови ( $139 \pm 0,3$  ммоль/л по сравнению с  $136 \pm 0,25$  ммоль/л у крыс WAG). Эти данные, как и тенденция к снижению уровня альдостерона в плазме крови, также свидетельствуют в пользу наличия классической картины низкорениновой гипертонии у крыс НИСАГ.

Предполагается, что в основе формирования низкорениновой артериальной гипертонии у крыс НИСАГ лежит изменение функции ионных каналов почки. Нарушения почечной системы синтеза NO также могут быть включены в патогенез артериальной гипертонии у крыс изучаемой линии.

**Ключевые слова:** артериальная гипертония, ренин-ангиотензиновая система, линия крыс НИСАГ, ПЦР в реальном времени.

**ВВЕДЕНИЕ.** Этиология примерно 95% всех случаев артериальной гипертонии (АГ) точно не известна, и их относят к первичной, или эссенциальной, гипертонии (гипертонической болезни), развитие которой может быть обусловлено как наследственными, так и средовыми факторами [1]. Для изучения генетики и патофизиологии первичной АГ и для разработки новых антигипертензивных препаратов широко используются экспериментальные модели заболевания – такие линии крыс, как Лионская линия LH [2], линия SHR [3, 4], трансгенные крысы TGR mRen2, соль-чувствительная линия крыс Dahl (DS) и др. [4]. Одной из таких моделей являются крысы линии НИСАГ (ISIAH – в англоязычной литературе), полученные в Институте цитологии и генетики СО РАН [5, 6]. У крыс этой линии базальный уровень артериального давления (АД) превышает условную границу нормы и составляет 160-170 мм рт.ст. Уникальность данной линии состоит в том, что в полной мере повышение АД до 200 мм рт.ст. и выше у этих крыс происходит под действием легкого эмоционального стресса.

\* - адресат для переписки

Ранее было показано, что крысы линии НИСАГ со стресс-чувствительной артериальной гипертонией характеризуются усилением функциональной активности как гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной, так и симпатoadреналовой систем. Со стороны гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы имеется выраженное повышение транскрипционной активности генов, кодирующих кортикотропин рилизинг гормон и проопиомеланокортин, как в покое, так и особенно при стрессе [7]. Выявлена повышенная концентрация кортикостерона в плазме крови при разных видах стресса [8]. Со стороны симпатoadреналовой системы у крыс НИСАГ отмечено повышение содержания адреналина в надпочечниках, а также мРНК тирозингидроксилазы, ключевого фермента биосинтеза катехоламинов, как в надпочечниках, так и в отделах мозга, включающих тела норадренергических нейронов (*Locus coeruleus*) [7].

Что касается ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РАС), то полученные до сих пор данные скорее свидетельствуют об обратной ситуации, то есть в пользу понижения её функциональной активности. Показано снижение экспрессии генов ренина и циклооксигеназы COX-2 [9], а также уменьшение активности этих ферментов в почках крыс НИСАГ при нормальной [8] или пониженной [10] активности ренина в плазме крови. Активность ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ) в ткани легких и в плазме крови крыс НИСАГ не отличается существенно от значений, полученных для нормотензивных крыс [11].

Мы исследовали содержание мРНК основных генов ренин-ангиотензиновой системы почки у крыс линии НИСАГ методом ПЦР в реальном времени. В число изучаемых вошли гены ренина (*Ren*), ангиотензиногена (*Agt*), ангиотензин-превращающего фермента (*Ace*), рецептора ангиотензина II 1А типа (*AT1A*), а также гена циклооксигеназы COX-2 (простагландин-эндопероксид синтазы 2), катализирующей лимитирующую стадию синтеза простагландинов и тесно связанной с регуляцией активности ренина в почке. Кроме того, поскольку у крыс линии НИСАГ, как и у других гипертензивных животных, отмечены гипертрофические изменения сердечной мышцы [12], мы исследовали экспрессию генов *Ace* и *AT1A* в миокарде.

#### МЕТОДИКА.

**Экспериментальные животные.** Работа проделана на 4-х месячных крысах-самцах гипертензивной линии НИСАГ и нормотензивной линии WAG, содержащихся в условиях вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Крыс наркотизировали эфиром и забивали путем мгновенной декапитации, полученные органы (почки и сердце) помещали в жидкий азот. Плазму крови и образцы соединительной ткани (кожа и подкожная клетчатка) хранили при -20°C для последующего измерения концентрации натрия методом фотометрии пламени. Концентрацию альдостерона в плазме периферической крови измеряли иммуноферментным методом с использованием стандартного набора реактивов ELISA Kit ("Alpha Diagnostic International").

**Выделение РНК.** Суммарную РНК выделяли из кортикального слоя полюса почки и из миокарда левого желудочка методом фенольно-хлороформной экстракции [9]. Примеси геномной ДНК удаляли обработкой ДНКазой I ("Promega", США) согласно рекомендациям производителя фермента, после чего проводили повторную экстракцию смесью фенол/хлороформ и чистым хлороформом, а также осаждение этанолом. После центрифугирования осадок РНК растворяли в деионизированной воде. Качество выделенной РНК оценивали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле, количество – по оптической плотности при 260 нм.

**Обратная транскрипция.** Для получения кДНК смешивали 5 мкг РНК и 0,5 мкг "случайных" (random N<sub>6</sub>) праймеров-гексамеров в 11 мкл воды. После денатурации РНК (65°C, 5 мин) и отжига праймеров (37°C, 5 мин) добавляли 19 мкл смеси с обратной транскриптазой. Конечный раствор содержал буфер для обратной транскрипции (20 mM трис-HCl, pH 8,3, 10 mM DTT, 100 mM KCl,

5 mM MgCl<sub>2</sub>), 500 мкМ дезоксинуклеозидтрифосфатов и 40 ед. обратной транскриптазы MoMLV (ЗАО “Биосан”, Россия). Синтез кДНК проводили при 37°C 1 час, 42°C 30 мин, 50°C 10 мин. Фермент инактивировали прогревом смеси при 75°C 5 мин. Для последующей ПЦР использовали 0,25–0,5 мкл полученной кДНК.

*Приготовление “стандартной” кДНК.* Из всех полученных образцов кДНК отбирали равные объемы (3 мкл) и смешивали. Полученный “усредненный” раствор использовали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) для построения калибровочных кривых, по которым определяли относительный уровень кДНК для целевых генов и гена сравнения в экспериментальных образцах.

*ПЦР в реальном времени.* Для определения уровня экспрессии генов проводили ПЦР в реальном времени в присутствии красителя SYBR Green I (“Molecular Probes”, США) на амплификаторе iQ5 (Bio-Rad laboratories, США). В качестве гена сравнения использовали “ген домашнего хозяйства” *Rpl30* (ген рибосомного белка L30). Нуклеотидная последовательность праймеров приведена в таблице. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала стандартный буфер для ПЦР (67 mM трис-HCl, pH 8,9, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Твин 20, 10 mM β-меркаптоэтанол), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, SYBR Green I в разведении 1:20000, 150 нМ каждого из соответствующих праймеров и 1 Ед Taq-полимеразы с антителами (ЗАО “Вектор-Бест”, Новосибирск). Реакцию проводили в следующих условиях: предварительный прогрев при 94°C – 1 мин; затем 40 основных циклов: денатурация при 94°C – 15 с, отжиг (см. таблицу) – 20 с, элонгация при 72°C – 20 с, сбор данных по флуоресценции для *Rpl30* при 83°C – 10 с, сбор данных по флуоресценции для целевых образцов (см. таблицу) – 10 с. После окончания ПЦР снимали кривые плавления продуктов для контроля специфичности реакции. В каждом эксперименте на один планшет помещали образцы исследуемых кДНК с праймерами на целевой ген (по 4 повтора на образец кДНК); аналогичные образцы с праймерами на ген сравнения (также по 4 повтора); “стандартную” кДНК в разведениях от 1:1 до 1:64 с теми же праймерами (2 повтора). Для каждого образца кДНК ПЦР проводили не менее 2-х раз. По получаемым стандартным калибровочным кривым определяли исходный уровень исследуемых кДНК (относительно “стандартной” кДНК), и эту величину для целевых генов относили к количеству кДНК гена сравнения, определяя таким образом различия в уровнях экспрессии изучаемых генов между животными разных линий.

Таблица. Используемые в работе праймеры.

Ген	Нуклеотидная последовательность праймеров	T <sub>отж</sub>	T <sub>рег</sub>
<i>COX-2</i>	F: 5' – GCC ACC TCT GCG ATG CTC T – 3' R: 5' – GTG TTT GGG GTG GGC TTC A – 3'	64°C	85°C
<i>Ren</i>	F: 5' – CAC TCA TCA AGG GCT CTG TGT C – 3' R: 5' – TCT ATA CAG AGT TCG ACC GGC A – 3'	65°C	88°C
<i>Agt</i>	F: 5'-CCT CGC TCT CTG GAC TTA TC-3' R: 5'-CAG ACA CTG AGG TGC TGT TG-3'	63°C	87°C
<i>Ace</i>	F: 5' - ATG GTA CAG AAG GGC TGG AA - 3' R: 5' - TTG TAG AAG TCC CAC GCA GA - 3'	62°C	88°C
<i>AT1A</i>	F: 5' - AAA TGA GCA CGC TTT CTT ACC G - 3' R: 5' - TGA GGC AGG GTG AAT GGT CC - 3'	63°C	86°C
<i>Rpl30</i>	F: 5' - ATG GTG GCT GCA AAG AAG AC - 3' R: 5' - CAA AGC TGG ACA GTT GTT GG – 3'	62–65°C*	83°C

Примечание: T<sub>отж</sub> – температура отжига, T<sub>рег</sub> – температура регистрации флуоресценции.

\* - отжиг праймеров для гена сравнения проводили при той же температуре, что и отжиг праймеров для целевого гена.

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ РЕНИНОВОЙ СИСТЕМЫ У ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС НИСАГ

**Статистический анализ.** Все статистические расчеты производили с помощью программного пакета Statistica 5.5 ("Statsoft", США). Использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Результат считали статистически значимым при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Исследование показало, что у крыс линии НИСАГ имеется достоверное снижение базального уровня мРНК генов ренин-ангиотензиновой системы в почке по сравнению с крысами линии WAG: ренина – на 45% ( $p < 0,005$ ), *Ace* – на 43% ( $p < 0,005$ ), рецепторов ангиотензина II *AT1A* – на 34% ( $p < 0,05$ ). Уровень экспрессии гена *COX-2* был снижен вдвое ( $p < 0,00005$ ). Исключением является ген *Agt*, для которого отмеченное снижение уровня мРНК на 18% не является статистически достоверным (рис. 1).

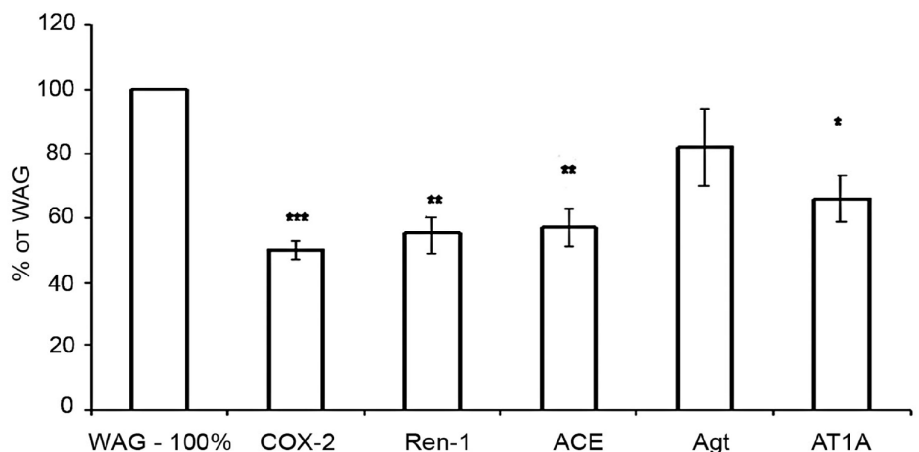


Рисунок 1.

Уровень содержания в почках мРНК генов ренин-ангиотензиновой системы у крыс линии НИСАГ в процентах от уровня контрольной линии WAG ( $M \pm SE$ ).

\* - достоверные различия,  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,005$ ; \*\*\* -  $p < 0,00005$ .

В миокарде, как и в почке, наблюдается пониженный уровень экспрессии гена рецептора *AT1A* (на 28%,  $p < 0,05$ ). Однако содержание мРНК *Ace* в миокарде оказалось значительно повышенным – на 80% ( $p < 0,01$ ) (рис. 2).

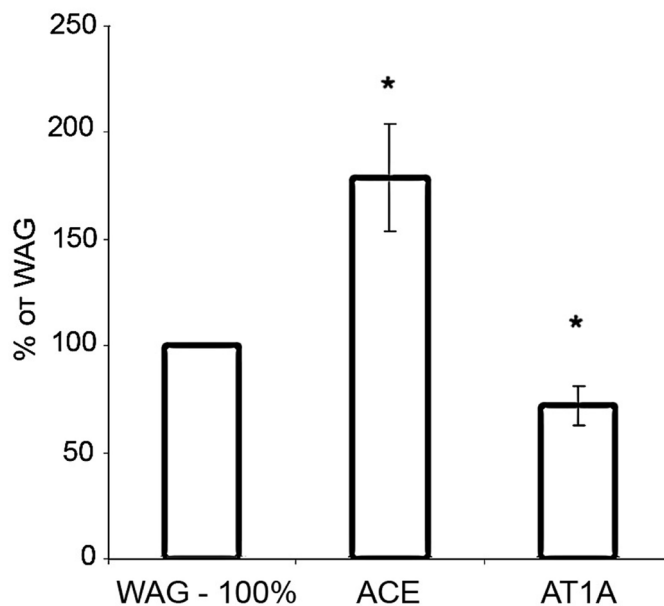


Рисунок 2.

Уровень содержания в миокарде мРНК генов ренин-ангиотензиновой системы у крыс линии НИСАГ в процентах от уровня контрольной линии WAG ( $M \pm SE$ ). \* - достоверные различия,  $p < 0,05$ .

Отмечено достоверное повышение концентрации натрия в плазме крови крыс НИСАГ, которая составила  $139 \pm 0,3$  ( $n=10$ ) ммоль/л, в то время как у нормотензивных крыс WAG -  $136 \pm 0,25$  ( $n=10$ ) ммоль/л ( $p<0,01$ ). Значительно больше оказалась разница между линиями по концентрации натрия в соединительной ткани с преобладанием этого показателя у крыс НИСАГ:  $124 \pm 4,3$  ( $n=10$ ) ммоль/кг и  $62 \pm 4,1$  ( $n=10$ ) ммоль/кг – у крыс WAG ( $p<0,001$ ).

По концентрации альдостерона в плазме крови достоверных межлинейных различий найдено не было:  $93 \pm 20$  ( $n=10$ ) пг/мл у крыс WAG и  $73 \pm 15$  ( $n=10$ ) пг/мл – у крыс НИСАГ. Тем не менее, хотелось бы отметить наличие тенденции к снижению концентрации альдостерона у крыс НИСАГ, так как в некоторых ранее проведенных исследованиях это снижение достигало степени статистической достоверности [8].

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Полученные результаты свидетельствуют об уменьшении базальной активности РАС у гипертензивных крыс линии НИСАГ, что, очевидно, надо рассматривать в контексте представлений о низкорениновой форме артериальной гипертензии. Низкорениновая гипертензия составляет примерно третью часть случаев гипертонической болезни человека. Она характеризуется, помимо снижения активности ренина, некоторыми специфическими особенностями, такими как повышение чувствительности АД к соли, увеличением объема внеклеточной жидкости, в том числе плазмы крови, и накоплением в организме натрия. Кроме того, экспериментальные исследования показали, что низкорениновая солечувствительная гипертензия связана со сниженным уровнем синтеза NO и с дефектом зависимой от эндотелия вазодилатации [13], подтверждая тем самым, что нарушения системы NO также включены в развитие гипертензии.

В литературе описано несколько моделей низкорениновой формы гипертензии. К ним относятся гипертензивные крысы линии Lion (LH), у которых уровень ренина и проренина как в плазме, так и в почке значительно ниже по сравнению с контролем. Экскреция альдостерона у них также заметно снижена. Помимо низкого базового значения, синтез ренина в почке у крыс LH слабо реагирует на такие физиологические стимулы, как снижение почечного перфузионного давления и  $\beta$ -адренергическую стимуляцию. Наконец, как это часто наблюдается у пациентов с низкорениновой формой АГ, крысы LH оказались солечувствительными [2].

Низким уровнем ренина характеризуется и другая солечувствительная линия - крысы Dahl SS (DS). Не только активность ренина плазмы, но и концентрация альдостерона плазмы значительно понижены у крыс DS, находившихся на высокосолевого диеты с возраста 7 недель, хотя уровень кортикостерона плазмы не отличался от контроля [14]. Исследования на крысах DS показали, что как и у человека, низкорениновая солечувствительная гипертензия – это специфическое состояние, которое характеризуется пониженной биодоступностью NO, что проявляется в нарушении NO-зависимой сосудистой релаксации и повышении чувствительности сосудов к действию ангиотензина II (Ang II). Блокада рецептора AT1 нормализовала состояние таких подопытных животных [3].

Несмотря на некоторую противоречивость литературных данных, большинство исследователей, работающих с крысами SHR, также относят их к нормо- или низкорениновой форме гипертензии [15]. Однако в раннем возрасте у этих крыс отмечен период, когда активность ренина в плазме повышена [16]. В этом периоде короткая блокада РАС у крысят SHR индуцирует снижение кровяного давления, которое остается заметным в течение нескольких недель после снятия блокады [17]. Можно полагать, что повышение функциональной активности рениновой системы почки в раннем онтогенезе является необходимым этапом формирования гипертензивного статуса у крыс SHR.

Ранний всплеск активности РАС мог бы объяснить развитие гипертензии и у крыс LH. Однако выяснилось [2], что стойкий эффект блокады РАС, наблюдаемый у SHR, не является всеобщим свойством, а скорее специфичен для этой японской линии.



Проведённые ранее исследования линии крыс НИСАГ показали, что активность ренина и уровень альдостерона плазмы не превышают соответствующие показатели у нормотензивной линии крыс WAG [8, 11]. Был показан и сниженный уровень NO-синтазы (NOS)1 в почке [8]. Приведённые данные, несомненно, позволяют отнести линию крыс НИСАГ к группе моделей низкорениновой формы гипертонии. Данные по измерению концентрации натрия в плазме крови и в соединительной ткани, которая является естественным депо натрия в организме, также свидетельствуют в пользу наличия классической картины низкорениновой гипертонии у крыс НИСАГ. Для депо натрия, каковым является соединительная ткань, такая большая разница между линиями животных, очевидно, допустима, и она значительно меньше в плазме крови, в которой концентрации ионов строго гомеостатированы.

Известно, что между рениновой системой почки и уровнем натрия в организме существуют реципрокные отношения: с одной стороны, РАС призвана задерживать натрий, с другой стороны, задержка натрия приводит к угнетению почечной рениновой системы, что мы и наблюдаем. Однако, в таком случае к задержке натрия должны приводить другие причины. В литературе описаны некоторые формы артериальной гипертонии, которые сопровождаются накоплением натрия на фоне снижения функции рениновой системы почки. В частности, это так называемый синдром “кажущегося избытка минералокортикоидов” (apparent mineralocorticoid excess) [18]. Синдром развивается по причине ослабления функции  $11\beta$ -гидростероид дегидрогеназы ( $11\beta$ -HSD2), фермента, который у человека переводит кортизол в кортизон, а у крыс – кортикостерон в 11-дегидрокортикостерон и тем самым защищает минералокортикоидные рецепторы от избыточной стимуляции глюкокортикоидами, которых секретируется на два порядка больше, чем альдостерона. При этом задержка натрия происходит фактически без участия альдостерона, секреция которого может даже снижаться вследствие подавления рениновой системы почки. Однако, для крыс НИСАГ ранее было показано, что активность  $11\beta$ -HSD2 в почке не только не уменьшена, но даже увеличена по сравнению с нормотензивными крысами [19]. Второй вариант усиленной задержки натрия при угнетенной функции рениновой системы может быть объяснен нарушением функции самих транспортных ионных каналов почки, которые являются мишенью альдостерона. Это характерно для так называемого синдрома Лиддля, когда находят мутации генов, кодирующих синтез субъединиц эпителиального натриевого канала ENaC. В работе Amstislavsky et al. [8] было показано, что экспрессия мРНК ENaC, как и других ион транспортирующих каналов, в почке крыс НИСАГ повышена. Эта особенность, очевидно, нуждается в дальнейшем исследовании, однако с большой вероятностью можно предположить, что именно изменение функции ионных каналов почки лежит в основе формирования низкорениновой артериальной гипертонии у крыс НИСАГ.

Наши эксперименты на модели стресс-индуцируемой артериальной гипертонии показывают, что эта форма артериальной гипертонии сопровождается значительной функциональной активацией симпатoadреналовой системы [7]. Повышенная симпатическая нервная активность может вызывать рост артериального давления путем прямой вазоконстрикции и увеличения силы и частоты сердечных сокращений.

Изменения в функции артериального и почечного барорефлекса также вовлечены в развитие гипертонии. Барорефлекс отвечает на изменения АД, поддерживая давление близким к установочной точке. В ответ на его статическое повышение, барорефлекс быстро переустанавливается в сторону более высокого давления [20]. Таким образом, в гипертензивных условиях переустановка барорефлекса может давать свой вклад в поддержание высокого АД. У крыс линий SHR, LH и DS чувствительность артериального барорефлекса снижена по сравнению с нормотензивным контролем, приводя к ослабленному

барорефлекторному контролю над частотой сердцебиений и активностью симпатической системы [4]. Существуют данные о том, что барорецепторный механизм в почке играет доминирующую роль в регуляции продукции ренина [21]. Можно полагать, что частые эпизоды повышения АД у юных крыс НИСАГ, как следствие повышенной чувствительности их симпатoadреналовой системы к мягкому эмоциональному стрессу и “стрессу жизни” [7], также может приводить к переустановке барорефлекса, влияя на уровень активности РАС.

Многие экспериментальные данные подтверждают роль COX-2 как медиатора выброса ренина [22]. Простаноиды, в образовании которых участвуют COX-2, играют важную роль в регулировании реабсорбции Na и воды, а также включены в модулирование экскреции Na. Ингибирование COX-2 приводит к уменьшению стимулированной Ang II (через экспрессию фосфолипазы A2) почечной продукции простагландинов PGE2 и PGI2. Почечный медуллярный кровоток, объем мочи, экскреция натрия снижаются при ингибировании COX-2 [23]. Вместе с тем, Ang II может ингибировать экспрессию COX-2 в коре почки через стимуляцию своего рецептора AT1. И наоборот, показано, что ингибирование COX-2 повышает и продлевает прессорный эффект Ang II [22, 23]. Ингибирование COX-2 рофекоксибом значительно повышает систолическое давление у крыс SHR и WKY при нормальной и высокосолевой диете, но не у крыс на низкосолевой диете, что подтверждает мнение, что гипертензия, индуцированная ингибированием COX-2, может иметь место независимо от генетической предрасположенности и может быть предотвращена снижением потребления соли [22]. Снижение уровня экспрессии гена COX-2 у крыс НИСАГ может быть результатом повышенной концентрации в плазме кортикостерона, и это, в свою очередь, может вести к уменьшению содержания ренина в почке, поскольку оно находится под влиянием локально высвобождаемых простагландинов [22]. Вместе с тем, более поздние исследования свидетельствуют, что простаноиды, – образованные при помощи COX-2 играют роль в регуляции секреции ренина, но не экспрессии гена ренина [24]. Этой же группой исследователей было показано влияние на регуляцию экспрессии этого гена NO-синтазы (NOS1), поскольку ингибитор активности NOS1, в отличие от рофекоксиба, способен снижать уровень рениновой мРНК [25].

Таким образом, можно предположить, что изменение функции ионных каналов почки (наряду с усилением активности гипоталамико-адреналокортикальной и симпатoadреналовой систем) может быть одним из факторов формирования низкорениновой артериальной гипертензии у крыс НИСАГ. Кроме того, пониженный уровень активности ренина – лимитирующего звена РАС – в почках крыс линии НИСАГ может быть обусловлен сниженной благодаря высокому уровню кортикостерона активностью COX-2. В то же время можно предположить связь пониженной экспрессии гена ренина с уменьшением активности NOS1, отмеченным у этих животных [8].

Конечно, мы не можем исключить действие и других механизмов повышения АД. В частности, нами показано, что в миокарде крыс НИСАГ экспрессия гена *Ace* существенно повышена и, несмотря на снижение плотности рецепторов ангиотензина II в этой ткани, мы не можем исключить гипертензивного действия локальной РАС, которая активно функционирует в миокарде и в стенках артериальных сосудов. Эта локальная рениновая система относительно автономна и может приводить к изменениям, влекущим за собой повышение АД, – утолщению мышечного слоя сосудистой стенки и гипертрофии миокарда.

Многочисленные исследования указывают на связь кардиальной гипертрофии с измененной экспрессией компонентов сердечной РАС. Данные *in vitro* и *in vivo* подтверждают, что как локальные механические стимулы, так и повышенная солевая нагрузка служат важными регуляторами активности кардиальной РАС. На сердце собаки с экспериментально вызванной гипертрофией желудочков показано [26], что такая гипертрофия ассоциирована с ростом уровня мРНК ACE и рецептора AT2 и с падением экспрессии химазы и рецептора AT1,

в то время как уровни экспрессии генов *Agt* и ренина остаются неизменными. Таким образом, компоненты РАС сердца регулируются независимо и различно, и противоположные изменения в их экспрессии могут выражать различные роли этих компонентов РАС в гипертрофии сердца.

Ряд исследователей полагает, что гипертрофию сердечной мышцы вызывает повышенный уровень *Ang II* через *AT1A*-зависимый механизм. Промотор гена *AT1A* активен в сердечной мышце, и его экспрессия индуцируется повышением давления. *Ang II* индуцирует сердечную и сосудистую клеточную гипертрофию прямой активацией рецептора *AT1* и косвенно – стимуляцией выброса некоторых факторов роста и цитокинов [27]. Переустановка барорефлексного контроля сердца ангиотензином *II* также опосредована рецепторами *AT1*, и базальный уровень эндогенного *Ang II* воздействует на кардиальный барорефлекс, повышая установочную точку, вокруг которой барорефлекс регулирует уровень сердечных сокращений [28].

Однако, существует и немало экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что нет прямой связи между кардиальной гипертрофией и уровнем содержания рецепторов *AT1* [29]. Изучение мышей с нокаутом рпо *AT1* рецептора, показало, что сердечная гипертрофия в ответ на гемодинамическую нагрузку может формироваться независимо от *AT1* [30].

Крысы линии *DS* при высокой солевой нагрузке развивают сердечную гипертрофию непропорционально степени гипертензии. У таких крыс экспрессия гена и активность *ACE* в левом желудочке повышались по сравнению с условиями нормальной диеты. Блокада симпатической активности мозга предотвращала гипертонию, но не изменения в параметрах *ACE* и весе сердца [31]. Другими исследователями было показано, что содержание не только мРНК *ACE*, но и рецептора *AT1A* в миокарде повышается у крыс *DS-CHF* по сравнению с контролем [14]. По мнению авторов, в этой модели низкорениновой гипертензии в развитии гипертрофии сердца может участвовать вызванная глюкокортикоидами активация минералокортикоидного рецептора [14].

Много работ посвящено исследованию различий в кардиальной РАС у крыс линии *SHR* и их нормотензивных контролей *WKY*. Отмечена повышенная экспрессия мРНК *Agt*, *ACE* и *AT1A* рецепторов в сердце у крыс *SHR* по сравнению с *WKY* [32]. При этом регуляция мРНК *ACE* и рецептора *AT1A* ангиотензином *II* наблюдалась только у крыс *SHR*, но не у контрольной линии крыс *WKY* [32].

В отличие от крыс гипертензивных линий *SHR* и *DS*, у крыс линии *НИСАГ* в миокарде мы наблюдали повышенную экспрессию гена *ACE* и пониженную – *AT1A*. Это может свидетельствовать о связи компонентов кардиальной РАС как с формированием гипертензивного статуса крыс линии *НИСАГ*, так и с развитием гипертрофии сердца. Установление причинно-следственного характера этих связей предполагается в дальнейших исследованиях.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Результаты наших исследований указывают на достоверное снижение базального уровня мРНК генов ренин-ангиотензиновой системы в почке взрослых крыс гипертензивной линии *НИСАГ* по сравнению с крысами линии *WAG*, что позволяет отнести изучаемую линию к моделям с низкорениновой формой гипертензии. Мы полагаем, что в основе формирования гипертензивного статуса крыс линии *НИСАГ* лежит изменение функции ионных каналов почки. В развитие артериальной гипертензии у крыс *НИСАГ* могут давать свой вклад высокая активность симпатической нервной системы и переустановка барорецепторного механизма. Кроме того, пониженный уровень активности ренина в почках крыс линии *НИСАГ* может быть обусловлен уменьшением активности *COX-2* и *NOS1*. Вместе с тем, измененная экспрессия генов *РАС* в сердце крыс линии *НИСАГ* может свидетельствовать о связи локальной рениновой системы миокарда с развитием гипертензии у животных этой линии.

Работа поддержана грантами РФФИ №08-04-00533 и Министерства образования и науки РФ (грант №№ 3Н-319-09 и 02.740.11.0705).



## ЛИТЕРАТУРА

1. *Lalouel J.-M.* (2003) *Am. J. Hypertens.*, **16**, 163-166.
2. *Sassard J., Lo M., Liu K.-L.* (2003) *Acta Pharmacol. Sin.*, **24**, 1-6.
3. *Zhou M.-S., Schulman I.H., Pagano P.J., Jaimes E.A., Raij L.* (2006) *Hypertension*, **47**, 81-86.
4. *Veerasingham S.J., Raizada M.K.* (2003) *Brit. J. Pharmacol.*, **139**, 191-202.
5. *Маркель А.Л.* (1985). *Изв. АН СССР*, **3**, 466-469.
6. *Markel A.L.* (1992) in: *Genetic Hypertension. Colloque INSERM*, vol. 218 (*Sassard J.*, ed.), J. Libbey Eurotex, London, pp.405-407.
7. *Markel A.L., Redina O.E., Gilinsky M.A., Dymshits G.M., Kalashnikova E.V., Khvorostova Yu.V., Fedoseeva L.A., Jacobson G.S.* (2007) *J. Endocrinol.*, **195**, 439-450.
8. *Amstislavsky S., Welker P., Fruhauf J.H., Maslova L., Ivanova L., Jensen B., Markel A.L., Bachmann S.* (2005) *Histochem. Cell Biol.*, **8**, 1-9.
9. *Федосеева Л.А., Дымишиц Г.М., Якобсон Г.С., Маркель А.Л.* (2009) *Бюлл. экспер. биол. мед.*, **147**(2), 134-138.
10. *Черкасова О.П., Федоров В.И.* (2006) *Вестник ТГУ*, **21**, 167-168.
11. *Черкасова О.П., Федоров В.И., Маркель А.Л.* (2005) *Бюлл. экспер. биол. мед.*, **140**(10), 381-383.
12. *Markel A.L., Maslova L.N., Shishkina G.T., Bulygina V.V., Machanova N.A., Jacobson G.S.* (1999) in *Handbook of Hypertension*, vol. 19 (*Birkenhager W.H., Reid J.L.*, ed.), Elsevier, Amsterdam e.a., pp. 493-526.
13. *Duffy S.J., Biegelsen E.S., Eberhardt R.T., Kahn D.F., Kingwell B.A., Vita J.A.* (2005) *Hypertension*, **46**, 707-713.
14. *Nagata K., Obata K., Xu J., Ichihara S., Noda A., Kimata H., Kato T., Izawa H., Murohara T., Yokota M.* (2006) *Hypertension*, **47**, 656-664.
15. *Nakamura A., Johns E.J.* (1995) *Hypertension*, **25**, 581-586.
16. *Gomez R.A., Lynch K.R., Chevalier R.L., Wilfong N., Everett A., Carey R.M., Peach M.J.* (1988) *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **254**, F582-F587.
17. *Harrap S.B., Van der Merwe W.M., Griffin S.A., MacPherson F., Lever A.F.* (1990) *Hypertension*, **16**, 603-614.
18. *Wilson R.C., Dave-Sharma S., Wei J.-Q., Obeyesekere V.R., Li K., Ferrari P., Krozowski Z.S., Shackleton C.H.L., Bradlow L., Wiens T., New M.I.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10200-10205.
19. *Черкасова О.П.* (2006) *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **141**(1), 35-37.
20. *Andresen M.C., Yang M.* (1989) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **15**(Suppl), 19-30.
21. *Crowley S.D., Gurley S.B., Oliverio M.I., Pazmino A.K., Griffiths R., Flannery P.J., Spurney R.F., Kim H.-S., Smithies O., Le T.H., Coffman T.M.* (2005) *J. Clin. Invest.*, **115**, 1092-1099.
22. *Cheng H.-F., Harris R.C.* (2004) *Hypertension*, **43**, 525-530.
23. *Qi Z., Hao C.-M., Langenbach R.I., Breyer R.M., Redha R., Morrow J.D., Breyer M.D.* (2002) *J. Clin. Invest.*, **110**, 61-69.
24. *Kammerl M.C., Nüsing R.M., Seyberth H.W., Riegger G.A., Kurtz A., Krämer B.K.* (2001) *Pflügers Arch.*, **442**, 842-847.
25. *Castrop H., Kammerl M., Mann B., Jensen B.L., Krämer B.K., Kurtz A.* (2000) *Pflügers Arch.*, **441**, 235-240.
26. *Lee Y.-A., Liang C.-S., Lee M.-A., Lindpainter K.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11035-11040.
27. *Oparil S., Zaman M.A., Calhoun D.A.* (2003) *Ann. Intern. Med.*, **139**, 761-776.
28. *Wong J., Chou L., Reid I.A.* (1993) *J. Clin. Invest.*, **91**, 1516-1520.
29. *Nickenig G., Laufs U., Schnabel P., Knorr A., Paul M., Böhm M.* (1997) *Br. J. Pharmacol.*, **121**, 134-140.
30. *Wollert K.C., Drexler H.* (1999) *Cardiovasc. Res.*, **43**, 838-849.

31. Zhao X., White R., Van Huysse J., Leenen F.H. (2000) J. Hypertens., **18**, 1319-1326.
32. Naito Y., Tsujino T., Fujioka Y., Ohyanagi M., Iwasaki T. (2002) Hypertension, **40**, 827-833.

Поступила: 10. 03. 2009.

**RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM GENE EXPRESSION IN THE KIDNEY  
AND IN THE HEART IN HYPERTENSIVE ISIAH RATS**

**L.A. Fedoseeva<sup>1</sup>, M.A. Ryazanova<sup>1</sup>, E.V. Antonov<sup>1</sup>, G.M. Dymshits<sup>1,2</sup>, A.L. Markel<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,  
pr. Acad. Lavrennt'eva 10, Novosibirsk 630090, Russia; fax: (383)333-1278; e-mail: frumgarts@ngs.ru

<sup>2</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The content of mRNA of renin-angiotensin system (RAS) genes in the kidney and heart of hypertensive ISIAH and normotensive WAG rats was measured by the real-time PCR. Statistically significant decrease of RAS gene mRNA was registered in the kidney of ISIAH rats, including *Ren* (by 45%), *Ace* (43%), *AT1A* (34%), *COX-2* (50%). In the myocardium *AT1A* mRNA expression decreased by 28% while *Ace* mRNA expression increased by 80%. These results demonstrate the reduction of renal RAS basal activity in the hypertensive ISIAH rats, and this allows us to consider the ISIAH rat, as a low-renin hypertensive strain.

In support of this viewpoint, in the ISIAH rats, a two-fold increase in the connective tissue sodium concentration as well as statistically significant plasma sodium increase (from 136±0,25 µmol/l in WAG to 139±0,3 µmol/l in the ISIAH rats) were found. Our conclusion backed by a tendency of the ISIAH plasma aldosterone level decrease giving in sum a classical picture of a low-renin hypertensive state in the ISIAH rats.

It was suggested that the formation of low-renin arterial hypertension in the ISIAH rats may depend on changes in kidney ion channels function. In addition, renal NO system alterations could be also involved in the pathogenesis of arterial hypertension in the ISIAH rats.

**Key words:** arterial hypertension, renin-angiotensin system, ISIAH rat strain, real-time PCR.