

На правах рукописи

Антонова Ольга Сергеевна

**ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЙ
ГОМЕОСТАЗА ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ
НЕЙРОРЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ NAR-22 и GAP-43 У КРЫС**

03.03.01 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2011

Работа выполнена в лаборатории экспериментальной и клинической кардиологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН и в лаборатории методов и приборов иммунного и генетического анализа Института аналитического приборостроения РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Клюева Наталья Зиновьевна

Научный консультант: доктор технических наук, профессор
Курочкин Владимир Ефимович
Институт аналитического приборостроения РАН

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Клименко Виктор Матвеевич
НИИ Экспериментальной медицины СЗО РАМН

доктор биологических наук
Камышев Николай Григорьевич
Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН

Ведущая организация: Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова РАН

Защита диссертации состоится «__» _____ 2011 г. в ____ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.020.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН по адресу: 199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6).

Автореферат разослан «__» _____ 2011 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Н.Э. Ордян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Кальций — химический элемент, играющий центральную роль в биологических системах и контролирующей ключевые процессы в клетке. В живых структурах он может выполнять как гомеостатическую, так и динамическую функцию, участвуя в путях передачи сигнала в качестве вторичного мессенджера (Zigmond et al., 1999). Концентрация кальция внутри и вне клетки отличается на несколько порядков. Клетки крайне чувствительны к существенному увеличению градиента Ca^{2+} около мембраны, и малейшие изменения ее проницаемости приводят к значительным изменениям концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле. Поэтому для контроля этого параметра в клетке существует сложная система каналов, обменников и насосов, находящихся на плазматической и внутриклеточных мембранах. Кроме того, содержание кальция в клетке зависит и от внешних параметров. Так, если Ca^{2+} в организм поступает в недостаточном количестве, снижается эффективность его абсорбции в кишечнике и увеличивается реабсорбция Ca^{2+} почками, что вызывает появление в циркуляции паратиреоидного гормона и увеличение концентрации кальцитриола (Senteno et al., 2009). Недостаток Ca^{2+} в диете является фактором риска возникновения остеопороза и формирования камней в почках. Доказана связь между диетой с низким содержанием кальция и развитием гипертензии (Myers, Champagne, 2007; Чурина, 1988). Кроме этого, дефицит экзогенного кальция во время беременности и в раннем возрасте может являться одной из причин появления синдрома дефицита внимания с гиперактивностью у детей (СДВГ) (Yarlagadda et al., 2007).

Для населения Северо-Запада России одним из неблагоприятных факторов, вызывающих возникновение гипертензии в популяции, является многолетний дефицит экзогенного кальция, вызванный катастрофически низкой минерализацией питьевой воды. Концентрация кальция в невской воде составляет всего 8 мг/л воды вместо 80 мг/л, рекомендованных ВОЗ (Чурина, 1988). Поэтому изучение молекулярных механизмов, вовлеченных в формирование соответствующих широко распространенных и связанных с дефицитом кальция патологических состояний, весьма актуально.

Наиболее распространенной экспериментальной моделью нарушений обмена внутриклеточного кальция являются крысы со спонтанной гипертензией (линия SHR) (Kantak et al., 2008). У них показаны существенные нарушения механизмов, обеспечи-

вающих постоянство концентрации ионов кальция в цитоплазме клеток, что позволяет связать молекулярные перестройки в организме этих животных с их физиологическими особенностями, например, с проявлениями артериальной гипертензией и симптоматикой СДВГ. При этом может происходить изменение экспрессии важнейших нейрорегуляторных белков NAP-22 и GAP-43 — мажорных субстратов протеинкиназы С в головном мозге. Эти белки играют важнейшую роль в формировании нейрональных сетей, воздействуя на конусы роста аксонов и клеточные мембраны. Можно предположить, что негативный неврологический статус этих животных связан с изменением состояния этих белков, вызванным нарушениями обмена кальция в клетке.

Цели и задачи исследования.

Цель работы: изучить проявления генетически детерминированных нарушений обмена кальция у крыс на молекулярном уровне и на уровне целого организма в условиях нормального и недостаточного потребления экзогенного кальция.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Оценить влияние генетически детерминированных нарушений обмена внутриклеточного кальция и дефицита кальция в диете на характеристики развития крыс в раннем постнатальном онтогенезе;
- 2) Оценить влияние генетически детерминированных нарушений обмена внутриклеточного кальция и дефицита кальция в диете на выраженность артериальной гипертензии у половозрелых крыс;
- 3) Исследовать в онтогенезе содержание белков NAP-22 и GAP-43 в теменной коре и гиппокампе крыс со спонтанной гипертензией (линии SHR) и нормотензивных крыс (линия WKY) в условиях нормального и сниженного потребления кальция в диете;
- 4) Оценить влияние нормального и сниженного потребления кальция на уровень синтеза мРНК NAP-22 и GAP-43 в теменной коре и гиппокампе крыс со спонтанной гипертензией в онтогенезе по сравнению с нормотензивными крысами;
- 5) Установить соответствие между уровнем синтеза соответствующих мРНК и содержанием белков NAP-22 и GAP-43 у исследованных животных;
- 6) Оценить перспективность использования белков NAP-22 и GAP-43 в качестве маркеров генетически детерминированных нарушений обмена кальция в клетке.

Научная новизна. Впервые показано, что у крыс со спонтанной гипертензией

генетически детерминированные нарушения обмена кальция в клетке могут влиять не только на уровень артериального давления, но и на изменение синтеза мРНК и содержание нейрорегуляторных белков GAP-43 и NAP-22. Впервые у нормотензивных и гипертензивных крыс обнаружены межлинейные различия в количестве и структурных модификациях нейрорегуляторных белков GAP-43 и NAP-22. Впервые продемонстрированы межлинейные различия в уровне синтеза мРНК NAP-22 в теменной коре у животных на разных этапах раннего онтогенеза. Впервые показано, что дефицит экзогенного кальция пролонгирует аномальное повышение уровня мРНК NAP-22 у животных независимо от принадлежности к нормотензивной или гипертензивной линии. Впервые выявлены межлинейные различия в уровнях агрегации белка NAP-22 и степени протеолиза белка GAP-43 в мозге крыс SHR и WKY и их связь с нарушением гомеостаза кальция в клетке в раннем онтогенезе.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Крысы со спонтанной гипертензией и нормотензивные животные различаются не только по уровню артериального давления, но и по показателям скорости развития организма на ранних его этапах.

2. Дефицит экзогенного кальция увеличивает уровень артериального давления только у крыс линии WKY, при этом он не изменяет показатели скорости развития у крыс обеих линий.

3. У крыс со спонтанной гипертензией генетически детерминированные нарушения обмена кальция в клетке влияют на метаболизм важнейших нейрорегуляторных белков GAP-43 и NAP-22.

4. У крыс со спонтанной гипертензией дефицит экзогенного кальция, не изменяя уровня артериального давления и показателей скорости развития; приводит к увеличению уровня синтеза мРНК NAP-22, накоплению NAP-22 в теменной коре и к усилению протеолиза белка GAP-43 в синапсосомах.

Теоретическое и практическое значение работы. Решение фундаментальной проблемы формирования кальций-зависимых форм артериальной гипертензии и ассоциированных с ней заболеваний, невозможно без понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе стойкого повышения тонуса кровеносных сосудов, нарушений работы миокарда и изменений, возникающих в структуре и функции головного мозга, особенно в условиях депривации кальция. Результаты данного

исследования могут лечь в основу разработок прикладного значения, поскольку нарушения гомеостаза кальция приводят к тяжелейшим нарушениям функционирования различных систем организма и должны корректироваться уже в детском возрасте. Проведенные исследования показали, что белок NAP-22 может оказаться маркером формирования состояний, связанных с нарушениями обмена кальция в клетке, таких как кальций-зависимая форма артериальной гипертензии и СДВГ. Материалы работы используются при чтении курса лекций "Разработка и проектирования аналитической и экологической техники" в Санкт-Петербургском государственном университете аэрокосмического приборостроения. Проведенная сравнительная оценка эффективности выделения ДНК с использованием новых макетов приборов и классических методов очистки нуклеиновых кислот показала перспективы дальнейшего применения этих приборов, например, для проведения массовых медицинских анализов.

Апробация работы. Результаты исследования были доложены и обсуждены на Пятом международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2009) и представлены на III Конференции молодых ученых, аспирантов и студентов по молекулярной биологии и генетике, посвященной 120-летию Николая Ивановича Вавилова (Киев, 2007); на 4-м и 5-м Международных конгрессах "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 2007, 2009); на Первом и Втором международных конгрессах «Артериальная гипертензия – от Короткова до наших дней» (Санкт-Петербург, 2005, 2009); на IV Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 80-летию Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, 2005); на Форуме по исследованию аминокислот и белков (Вена, 2005); на II Международной конференции VIFI (Сарагоса, 2006); на 34-й Неделе науки СПбГПУ (Санкт-Петербург, 2006); на 10-й Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пущино, 2006).

Публикации. Основные положения диссертации отражены в 18 печатных работах, из них 3 статьи в рекомендуемых ВАК изданиях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 154 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 11 таблицами и 20 рисунками. Библиографический указатель включает названия 354 работ (12

отечественных и 342 иностранных источников).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Работа выполнена на 75 взрослых крысах линии SHR обоих полов массой 180-250 г; на 108 взрослых крысах линии WKY обоего пола массой 220-250 г. Онтогенетические исследования выполнены на 60 крысятах линии SHR и 60 крысятах линии WKY. При проведении экспериментов соблюдались все требования комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им И.П. Павлова РАН. Систолическое АД определяли в хвостовой артерии непрямым тахоосциллографическим методом. Объектами молекулярных исследований были теменная кора и гиппокамп крысят линий SHR и WKY возрастом 5, 13, 18 и 30 дней.

Влияние дефицита кальция в питьевой воде на некоторые характеристики постнатального развития крыс линий SHR и WKY (их нормотензивного контроля). Животные каждой линии делились на 2 группы. В первой - они получали питьевую воду, содержащую ионы кальция в концентрации, соответствующей нормам, рекомендованным ВОЗ (80 мг/л) (эти животные обозначены как +Ca). Во второй группе (обозначаемой как _Ca) получали невшскую питьевую воду, содержащую 8 мг Ca²⁺ на литр воды. Содержание кальция в твердых кормах обеспечивало суточную норму потребления в обеих группах.

Выделение тотальной мРНК и проведение ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией). Для выделения тотальной мРНК использовался набор Mini RNA Isolation II Kit™ (Zymo Research). Проведение обратной транскрипции осуществлялось при помощи комплекта реагентов «РЕВЕРТА». Все операции по термостатированию и проведению ПЦР в реальном времени проводились в амплификаторе АНК-32 (ИАП РАН). При проведении ПЦР в реальном времени использовались опубликованные последовательности праймеров к NAP-22 и GAP-43 и флуоресцентные зонды (ЗАО Синтол) (см., например, Антонова и др, 2009). В качестве внутреннего контроля использовали ген β-актина.

Экстракция белка NAP-22. Эксперименты по выделению белка NAP-22 проводились на образцах теменной коры и гиппокампа одинаковой массы, которые измель-

чали скальпелем, а затем гомогенизировали в буфере для лизиса из набора Mini RNA Isolation II Kit™ (Zymo Research). Для оценки общего содержания NAP-22 электрофорезом с последующим иммуноблоттингом NAP-22 в составе экстрактов гиппокампа или теменной коры предварительно дезагрегировали хлороформом. Хлороформенную фазу отбрасывали, в пробу добавляли ацетон в шестикратном количестве по отношению к начальному объёму экстракта. Белковый осадок собирали центрифугированием. Полученный при этом препарат в день приготовления разделяли гель-электрофорезом с уксусной кислотой и мочевиной по методу Панима и Чолкли (Panyim, Chalkley, 1969). Для оценки содержания неагрегированного NAP-22 гомогенат обрабатывали 1% тритоном X-100 и 5% хлорной кислотой (Mosevitsky et al., 1994) с последующим осаждением белков из растворимого материала добавлением ацетона до конечной концентрации 85%. Полученный препарат также анализировали гель-электрофорезом с уксусной кислотой и мочевиной (Panyim, Chalkley, 1969).

Метод поверхностного иммуноблоттинга и проявление иммунных реплик.

По окончании электрофореза белки из геля переносили на нитроцеллюлозную или поливинилидендифторидную мембрану (Amersham) (Plekhanov, 1996). В качестве первичных антител использовали поликлональные кроличьи антитела к белкам GAP-43 и NAP-22 крысы, любезно предоставленные А.Ю. Плехановым (ПИЯФ РАН); в качестве вторичных антител использовали мышинные антитела против иммуноглобулина G кролика (Santa Cruz Biotechnology), конъюгированные с пероксидазой хрена. Проявление иммунных реплик методом усиленной хемилюминесценции осуществлялось с помощью набора ECL (Amersham).

Устройства и приборы, используемые в исследовании. Оценивали эффективность двух устройств для экстракции нуклеиновых кислот в автоматизированном режиме, основанных на различных принципах действия. Оба устройства основаны на удобном и технологичном методе, при котором для выделения ДНК используются магнитные частицы, покрытые SiO₂ (Dubus et al., 2006). Процесс экстракции включал фазы сорбции ДНК или РНК на носителе, отделение носителя от растворов, замену растворов, перемешивание частиц в растворах для образования суспензии. В первом устройстве (МГТУ им. Н.Э. Баумана) отделение частиц носителя от раствора осуществлялось магнитным осаждением на стенках пробирки с пробой. В основу его действия заложено перемещение порций жидкости под действием перепада давлений воз-

духа. В основе действия второго устройства (ИАП РАН) лежал метод магнитной ротации. Для сепарации магнитных частиц из раствора стержень с одноразовым наконечником опускался в пробирку и намагничивался, далее он вместе с частицами переносился в пробирку со следующим реагентом, магнитное поле отключалось, частицы освобождались от стержня. Равномерное перемешивание магнитных частиц и прочих компонентов производилось за счет вращения стержня.

Оценка эффективности выделения ДНК с помощью приборов для автоматизированной экстракции нуклеиновых кислот. Для оценки эффективности выделения ДНК с помощью этих приборов использовалась плаزمида pUC-18 со вставкой фрагмента ДНК человека гена Fc - фрагмента IgG (ЗАО Синтол). Выделение плазмидной ДНК осуществлялось по опубликованному методу (Boom et al., 1991), где в качестве сорбента использовались магнитные частицы (ЗАО Синтол). Для контроля проводилось выделение ДНК с помощью коммерческого набора Invitrogen Charge Switch Plasmid ER Mini Kit (Invitrogen). При проведении ПЦР в реальном времени были использованы праймеры и зонды производства ЗАО Синтол, детали анализа описаны ранее (Антонова и др., 2010). Эффективность выделения оценивалась посредством сравнения изначального количества ДНК с полученным в ходе выделения.

Методы математической статистики. Значимость различий между уровнями мРНК NAP-22 и GAP-43 у сравниваемых групп животных устанавливали с использованием многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с применением теста Тьюки-Крамера ($\alpha = 0.05$). Для усреднения параметрических признаков использованы средние величины и средние отклонения, для непараметрических (процентов) – медианы и квартили. Достоверность различий проверена непараметрическим тестом Краскелла-Уоллеса ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Различия уровней систолического артериального давления (АД) у крыс SHR и WKY в трех последовательных поколениях при дефиците кальция в питьевой воде и ее достаточной минерализации. В табл. 1 показаны величины усредненного систолического артериального давления (мм рт.ст.) у самцов и самок крыс линий SHR и WKY, полученные в трех последовательных поколениях. Крысы содержались на нормализованной по Ca^{2+} или маломинерализованной питьевой воде. У крыс

линии SHR изначально высокое АД не зависело от уровня кальция, растворенного в питьевой воде, в то время как крысы линии WKY при недостатке в питьевой воде кальция обнаруживали пограничную гипертензию, которая исчезала при нормальной минерализации питьевой воды. По-видимому, нарушения обмена внутриклеточного кальция у крыс линии WKY не настолько выражены, и только дополнительное влияние дефицита экзогенного кальция усиливает их настолько, что они проявляются в повышении артериального тонуса.

Таблица 1. Влияние дефицита экзогенного кальция на систолическое артериальное давление (средние значения и стандартные отклонения, мм рт.ст.) у самцов и самок крыс линий SHR и WKY в трех последовательных поколениях.

	Первое поколение		Второе поколение		Третье поколение	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
SHR+Ca	180.0±4.6 n=4	172.5±6.2 n=4	174.2±2.1 n=9	165.0±5.1 n=5	178.6±2.9 n=7	169.4±1.7 n=9
SHR_Ca	175.0±4.6 n=4	170.0±4.6 n=4	169.2±2.6 n=6	165.3±1.8 n=7	175.0±2.8 n=8	165.3±1.2 n=8
WKY+Ca	125.5±3.2 n=8	133.3±2.5 n=9	130.5±3.2 n=12	122.2±2.4 n=8	123.4±3.8 n=8	125.6±2.4 n=8
WKY_Ca	144.3±3.5* n=8	138.5±2.1* n=8	148.6±2.4* n=8	138.4±2.5* n=8	142.8±4.6* n=8	134.5±3.2* n=7

* - $p < 0,01$ (по сравнению с WKY+Ca соответствующей группы)

Исследование показателей увеличения веса, скорости развития и плодовитости у крыс SHR и WKY в трех последовательных поколениях в условиях достаточного поступления экзогенного кальция и в условиях его дефицита. В табл. 2 представлены данные о влиянии дефицита экзогенного кальция на выживаемость экспериментальных животных в течение трех дней после рождения, а также возраст опущения и возраст открывания глаз в пометах крыс SHR и WKY. Из таблицы видно, что у крыс линии SHR, находившихся в условиях нормального потребления кальция с питьевой водой, количество крысят в помете и их выживаемость в первые три дня жизни были достоверно ниже, чем у нормотензивных крыс линии WKY. Несколько позже у них происходило открытие глаз и появление шерстяного покрова, совпадающие с на-

чалом включения механизмом восприятия звуковых и двигательных стимулов. Однако при сравнении этих показателей у крыс линий SHR и WKY было обнаружено, что межлинейные различия были выражены намного сильнее, чем вызванные дефицитом экзогенного кальция. Крысы со спонтанной гипертензией развивались существенно хуже в любых условиях.

Таблица 2. Влияние дефицита кальция на выживаемость и показатели скорости постнатального развития крыс SHR и WKY.

Признак	SHR+Ca	WKY+Ca	SHR_Ca	WKY_Ca
Общее число детенышей (штук) ^а	7.4±3.3*	10.5±3.2	7.0±3.5*	9.8±2.7
Доля самцов в потомстве (%) ^б	50 (33 – 67)*	60 (53 – 67)	56 (45 – 62)	55 (35 – 66)
Выживаемость потомства (%) ^б	67 (0 – 100)*	100 (85 – 100)	60 (0 – 100)	78 (82 – 100)
Возраст опушения (дни) ^а	11.2±1.3*	9.2±1.6	11.9±3.0*	8.9±1.0
Возраст открывания глаз (дни) ^а	17.9±1.4*	16.2±0.9	19.3±1.4*	16.2±0.9

а – среднее и стандартное отклонение * - p<0.05

б – медиана и квантили ** - p<0.01 (по сравнению с WKY той же группы)

Результаты многократного взвешивания животных, потреблявших нормальное и недостаточное количество кальция, показаны на рис. 1 (А и Б соответственно), отдельно для самцов и самок в возрасте от 40 до 120 дней. На рис.1 А видно, что крысы линии WKY набирают вес быстрее, чем крысы со спонтанной гипертензией (p<0.001 на каждый день взвешивания). Кроме того, в обеих линиях самцы набирают вес быстрее, чем самки, хотя и здесь выявлены межлинейные различия: самцы линии WKY весили достоверно (p<0.01) больше самок на протяжении всего периода измерений, а у крыс линии SHR различия между полами были достоверны (p<0.01) только на 90-й и 120-й дни жизни.

В результате изучения влияния дефицита экзогенного кальция на показатели увеличения веса, скорости развития и плодовитости у крыс SHR и WKY было показано, что этот фактор мало сказывается на динамике исследованных показателей. При этом межлинейные и гендерные различия были статистически достоверны.

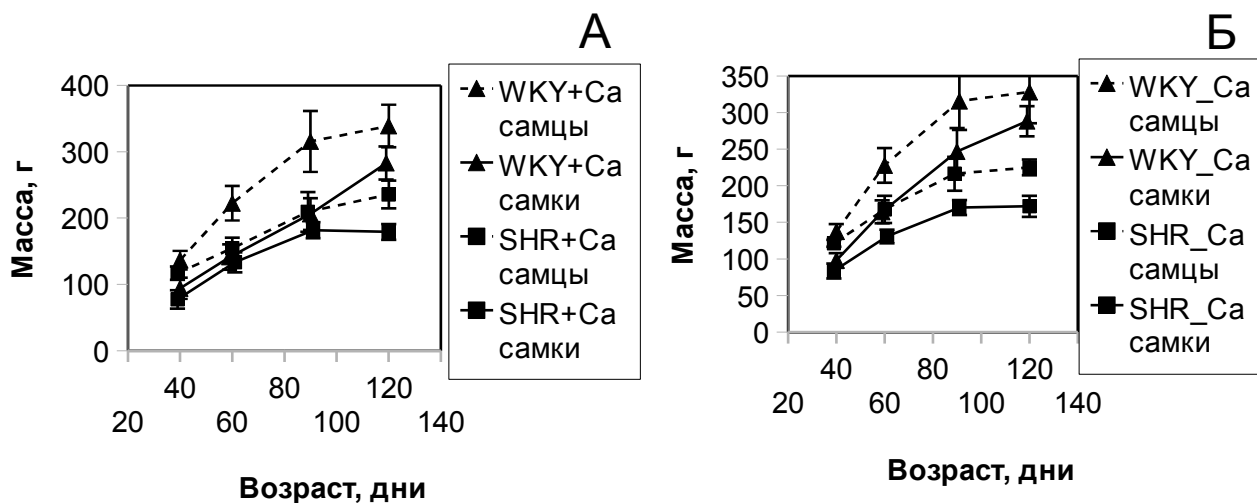


Рис. 1. Масса тела (граммы) крыс линий SHR и WKY в возрасте от 40 до 120 дней в условиях нормального потребления кальция (А) и в условиях дефицита экзогенного кальция (Б). Показаны средние значения и стандартные отклонения.

Межлинейные различия и влияние дефицита кальция в диете на уровень синтеза мРНК NAP-22 и GAP-43 в головном мозге крыс линий WKY и SHR в онтогенезе. При исследовании теменной коры на 5 и 13 дни постнатального развития были обнаружены межлинейные различия в уровне синтеза мРНК NAP-22, при этом у крыс SHR уровень мРНК был выше (рис.2). При дефиците кальция наблюдались сходные изменения в коре головного мозга как у гипертензивных, так и у нормотензивных животных. При этом у животных обеих линий наблюдалось увеличение уровня синтеза мРНК NAP-22 в 5, 13 и 18 дни постнатального развития. Стоит отметить, что у SHR, получавших достаточно кальция в воде, количество мРНК NAP-22 уже к 18 дню снижалось до уровня, характерного для нормотензивных животных. В то же время в гиппокампе всех исследованных животных мы не обнаружили существенной разницы в уровне мРНК NAP-22.

При сниженном потреблении кальция у всех исследованных животных уровень синтеза мРНК GAP-43 в теменной коре уменьшался только на 5 день постнатального развития. На 13, 18 и 30 дни эти различия исчезали (рис.3).

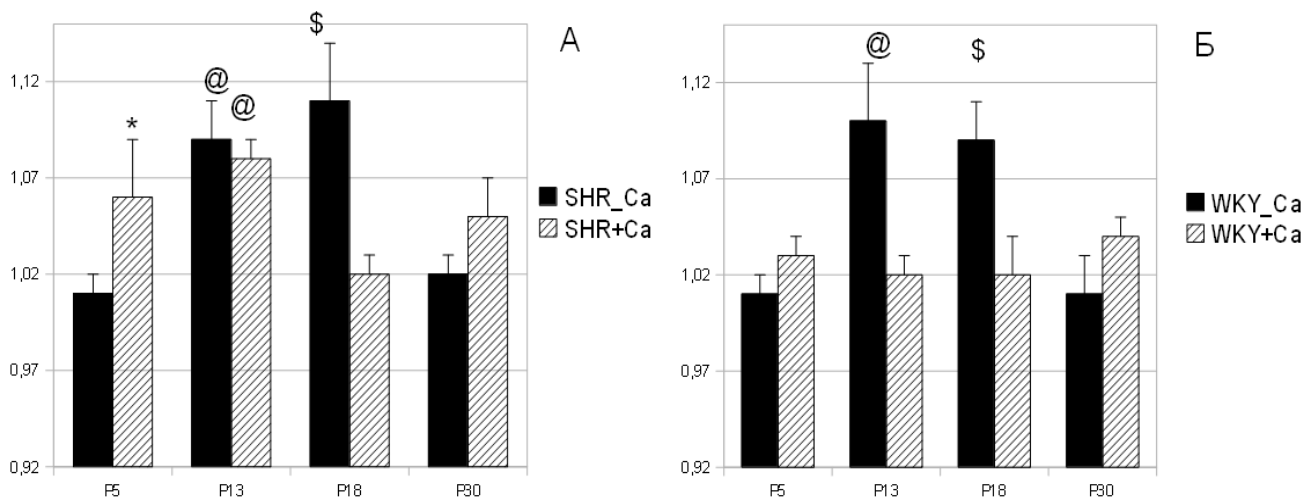


Рис. 2. Уровень синтеза мРНК NAP-22 в теменной коре крыс линий SHR (А) и WKY (Б) при нормальном (+Ca) и сниженном (_Ca) потреблении кальция, данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего. * — статистически достоверные различия от WKY+Ca P5. @ — статистически достоверные различия от WKY+Ca P13. \$ — статистически достоверные различия от WKY+Ca P18.

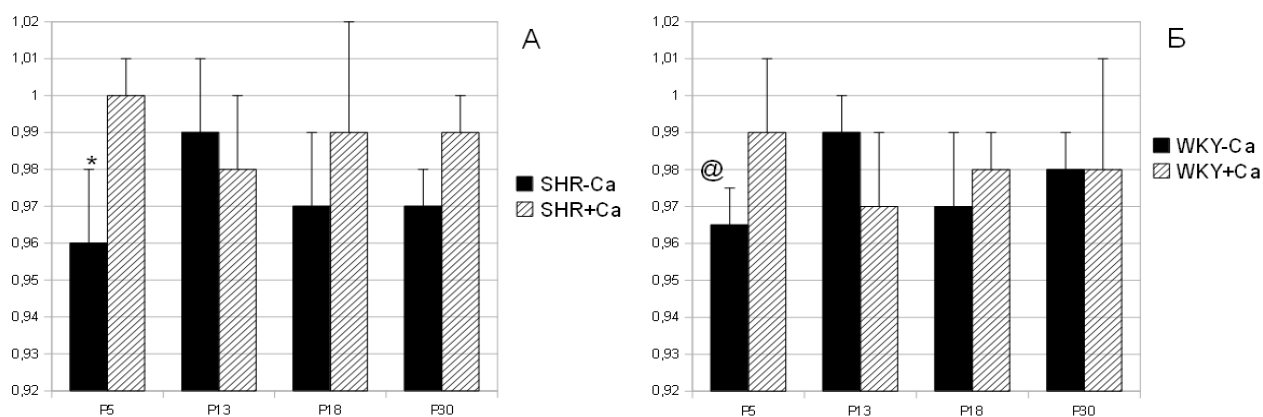


Рис. 3. Уровень синтеза мРНК GAP-43 в теменной коре крыс линий SHR (А) и WKY (Б) при нормальном (+Ca) и сниженном (_Ca) потреблении кальция, данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего. * — статистически достоверные различия от SHR+Ca P5. @ — статистически достоверные различия от WKY+Ca P5.

Оценка двух принципиальных подходов к разработке системы автоматизированного выделения нуклеиновых кислот. Мы провели практический анализ двух подходов к разработке автоматизированных систем выделения нуклеиновых кислот. Это может быть необходимо в том случае, если определения уровня синтеза мРНК белков NAP-22 и GAP-43 имеют важное диагностическое значения для ряда заболеваний: кальций-зависимые формы артериальной гипертензии, СДВГ, патогенез которого также связан с генетически детерминированными нарушениями обмена кальция в клетке, остеопороз и другие заболевания. Выход ДНК, полученный с помощью

предлагаемой для автоматизирования методики, составил примерно ту же величину с учетом погрешности, что и при выделении с помощью набора Invitrogen Charge Switch Plasmid ER Mini Kit. При работе с обоими устройствами было показано, что в автоматизированном режиме выход ДНК несколько превысил значения, полученные при ручном выделении при помощи того же протокола. Время выделения было примерно одинаковым для обеих систем. Полученные результаты можно считать удовлетворительными, однако модификация протокола, используемого в процессе выделения, позволила бы увеличить выход нуклеиновых кислот, улучшить воспроизводимость результатов и обеспечить возможность их стандартизации.

Влияние дефицита кальция в диете на содержание белка NAP-22 в коре и гиппокампе крыс линий WKY и SHR. Проведённые исследования выявили, что общее содержание NAP-22 в теменной коре нормотензивных крыс (WKY) при дефиците диетарного кальция существенно повышалось (рис. 4). При этом у крыс линии SHR уровень NAP-22 был неизменно высок, независимо от уровня поступления кальция. Указанное наблюдение оказалось справедливым для крыс всех исследованных возрастов. Известно, что крысы линии SHR обучаются существенно хуже, чем нормотензивные животные (Kantak et al., 2008). Таким образом, повышенное содержание NAP-22 в коре мозга таких крыс и увеличение синтеза его мРНК может быть связано с их пониженной обучаемостью. Полученные данные согласуются с распространёнными в литературе представлениями о том, что этот белок ответствен за ветвление нервных окончаний и установление межнейронных контактов, обучение и память.

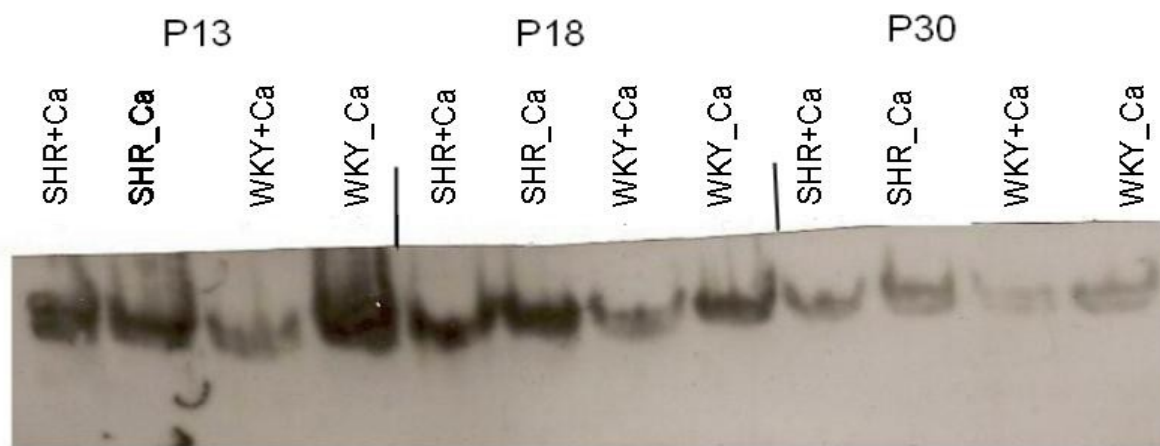


Рис. 4. Общее содержание NAP-22 в коре головного мозга крыс линий SHR и WKY в онтогенезе в норме и в условиях дефицита кальция в питьевой воде. Иммунореплика геля после электрофореза в системе с уксусной кислотой и мочевиной.

По большей части, NAP-22 в мозге представлен в виде агрегатов, состоящих из 10 или более "мономерных" молекул. Незначительная часть NAP-22 в мозге находится в неагрегированном состоянии (в виде "мономеров"). Нами показано, что уровень неагрегированного NAP-22 в теменной коре крысят линии SHR значительно снижается при дефиците кальция в диете. У крысят WKY уровень неагрегированного NAP-22 неизменно низок и практически не зависит от диетарного кальция. Отмеченное явление наиболее ярко проявилось в 5-ти и 18-ти дневном возрасте, но было отмечено и у крыс других исследованных возрастов.

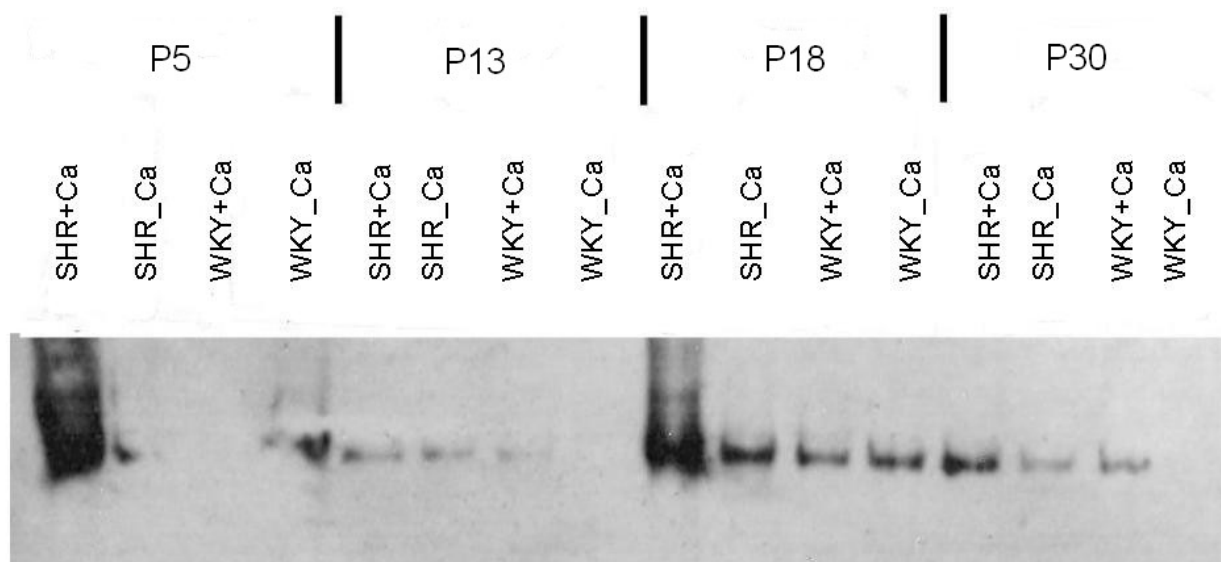


Рис. 5. Неагрегированный NAP-22 в коре головного мозга крыс линий SHR и WKY в онтогенезе в норме и в условиях дефицита кальция в питьевой воде. Иммунореплика геля после электрофореза в системе с уксусной кислотой и мочевиной.

Роль агрегации-деагрегации NAP-22 в процессах, происходящих в клетке, в настоящее время окончательно не установлена. Полученный нами результат может косвенно свидетельствовать о том, что именно мономерный (неагрегированный) NAP-22 участвует в процессах усиленного ветвления нервных отростков (ранний постнатальный период, в нашем случае, 5 дней) и установления повышенного числа нервных контактов (18 день), характерных для функционального восстановления нервной ткани (см. напр., Журавин и др., 2009). Вполне вероятно, что белок NAP-22 может быть вовлечен в формирование СДВГ в условиях сниженного потребления кальция, поскольку этот фактор вызывает выраженные молекулярные изменения исследуемого

белка в мозге экспериментальных животных в онтогенезе. Известно, что Ca^{2+} играет решающую роль во многих процессах, протекающих в ядре: транскрипции генов, синтезе ДНК, разрушении и репарации ядерной мембраны (Gerasimenko et al., 1996; Santella, 1996). Полученные нами данные показывают, что колебания содержания NAP-22 в теменной коре экспериментальных животных, скорее всего, связаны с изменением уровня синтеза мРНК этого белка, который, свою очередь, связан с уровнем внутриклеточного Ca^{2+} .

Нарушение когнитивной функции у крыс линии SHR не может полностью объясняться гипоперфузией головного мозга в результате повышения артериального давления. У крыс WKY патологически повышенный сосудистый тонус формировался лишь при дефиците кальция в питьевой воде, а у животных со спонтанной гипертензией он возникал в любом случае, независимо от содержания кальция в диете. В то же время нормализация катионного состава питьевой воды приводила у крыс SHR к распределению исследованных белков головного мозга, схожему с таковым у крыс линии WKY, в то время как артериальное давление у половозрелых крыс SHR не изменялось. Заметим, что гипертоническая болезнь развивается позже, чем отмеченные нами изменения содержания NAP-22 в мозге (Gattu et al., 1997). Таким образом, различные патологические состояния, связанные с дефицитом кальция в диете, могут иметь общие наследственно-обусловленные причины, но различаться по механизмам их молекулярной реализации.

ВЫВОДЫ

1. У крыс линии WKY дефицит экзогенного кальция вызывает рост артериального давления, приводя к формированию пограничной гипертензии.
2. Крысы линии SHR на ранних этапах онтогенеза по сравнению с крысами линии WKY демонстрируют отставание в развитии (у них позже открываются глаза и появляется шерстяной покров, хуже набирается вес), дефицит экзогенного кальция на эти различия влияния не оказывал.
3. У крыс линий SHR и WKY обнаружены межлинейные различия в количестве и структурных модификациях нейрорегуляторных белков GAP-43 и NAP-22.
4. Показаны межлинейные различия в уровне синтеза мРНК NAP-22 в теменной коре, при этом дефицит экзогенного кальция увеличивал количество мРНК у

животных обеих линий и пролонгировал экспрессию этого белка у крыс линии SHR.

5. У крыс со спонтанной гипертензией изменения синтеза мРНК и содержания белков GAP-43 и NAP-22, вызванные генетически детерминированными нарушениями обмена кальция в клетке, могут негативно влиять на процессы формирования центральной нервной системы в раннем онтогенезе.

6. Поскольку белок NAP-22 не является нейроспецифическим, изменения его экспрессии при дефиците кальция в диете в других органах и тканях могут быть использованы в качестве маркера состояний, связанных с нарушениями обмена кальция в клетке.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ключева Н.З., Петрова Е.И., Антонова О.С., Мосевичкий М.И., Захаров В.В. Количественные и структурные изменения белков головного мозга GAP-43 и BASP1 при экспериментальной гипертензии // Материалы IV Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 80-летию Института физиологии им. И.П.Павлова РАН «Механизмы функционирования висцеральных систем». – Санкт-Петербург, 2005. С. 115.
2. Antonova O.S., Zakharov V.V., Mosevitsky M.I., Klioueva N.Z., Tchurina S.K., Petrova E.I. Calcium intake dependent changes of the brain proteins, GAP-43, BASP1 and MARKS, in spontaneously hypertensive rats // The Forum for Amino Acids and Protein Research. Amino Acids V.29(1). – Vienna, Austria, 2005. P. 9.
3. Klueva NZ, Petrova EI, Mosevitsky MI, Antonova OS. Quantitative and structural changes in brain proteins GAP-43 and BASP1 in spontaneously hypertensive rats // International Congress «Hypertension - from Korotkov to present days». #A124. - St-Petersburg, 2005. P. 59.
4. Antonova O.S., Klioueva N.Z., Zakharov V.V., Petrova E.I., Mosevitsky M.I, Makarov V.L. Brain proteins GAP-43, BASP1 expression and maturing dependence on calcium intake in spontaneously hypertensive rats under experimental hypertension // II International Conference BIFI «From Physics To Biology: The Interface Between Experiment and Computation». – Zaragoza, Spain, 2006. P. 69.
5. Антонова О.С., Захаров В.В. Развитие спонтанной гипертензии и нарушений молекулярных процессов в головном мозге крыс линии WKY и SHR в условиях деприва-

ции кальция в постнатальном периоде // Тезисы докладов 34-ой Недели науки СПбГ-ПУ - Всероссийской межвузовской научно-технической конференции студентов и аспирантов. Ч.4. — Санкт-Петербург, 2006. С. 24.

6. Antonova O. S., Klioueva N. Z., Petrova E. I., Makarov V. L., Mosevitsky M. I. & Zakharov V. V. Low calcium intake results in molecular alterations of brain proteins GAP-43 and BASP1 in early postnatal development of spontaneously hypertensive rats // FENS Abstr. V. 3.- Vienna, Austria, 2006. A222.2.

7. Антонова О.С., Захаров В.В. Развитие спонтанной гипертензии и нарушений молекулярных процессов в головном мозге крыс линий SHR и WKY в условиях недостатка кальция в питьевой воде // Тезисы 10-й Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века». - Пущино, 2006. С. 126.

8. Антонова О.С., Сальникова Т.А., Ключева Н.З., Петрова Е.И. Разработка метода ранней диагностики патологических состояний опорно-двигательного аппарата, сосудистого тонуса и нарушений формирования нейрональных сетей, вызванных дефицитом экзогенного кальция // Материалы Четвертого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». - Москва, 2007. С. 127.

9. Antonova O.S., Rumiantseva I.A., Salnikova T.A., Klioueva N.Z., Petrova E.I. Capillary electrophoresis of proteins BASP1 and GAP-43. Prospects for clinical diagnostics // Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics, dedicated to 120th anniversary of M.I.Vavilov. Abstract book. - Kyiv, Ukraine, 2007. P. 158.

10. Ключева Н.З., Антонова О.С., Петрова Е.И. Влияние дефицита экзогенного кальция на уровень артериального давления и модификацию белков головного мозга GAP-43 и BASP1 у крыс линий SHR и WKY // БЭБИМ — 2008. Т. 145, № 3. — С. 244-247.

11. Корнева Н.А., Чернышев А.В., Кюрджиев Ю.В., Антонова О.С., Варламов Д.А., Алексеев Я.И. Система автоматической подготовки пробы для проведения полимеразной цепной реакции // Сборник трудов 10-й научно-технической конференции "МЕД-ТЕХ — 2008". - Монастир, Тунис, 2008. С. 153-156.

12. Klioueva N.Z., Antonova O.S., Korneva N.A. Expression and structural modifications of brain proteins NAP-22 и GAP-43 in spontaneously hypertensive rats in ontogenesis // International interdisciplinary congress "Neuroscience for medicine and psychology". Abstract book. – Sudak, Crimea, Ukraine, 2009. P. 123-124.

13. Корнева Н.А., Антонова О.С., Ключева Н.З. Исследование экспрессии и структур-

ных модификаций сигнального белка нервных окончаний GAP-43 на экспериментальной модели синдрома дефицита внимания с гиперактивностью (крысы линии SHR) // Материалы Пятого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Т. 1. – Москва, 2009. С.152-153.

14. Корнева Н.А., Антонова О.С. Оценка эффективности прибора для автоматического выделения нуклеиновых кислот // Материалы Пятого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Т. 1. – Москва, 2009. С. 414-415.

15. Ключева Н.З., Антонова О.С., Петрова Е.И. Белки-субстраты протеинкиназы С – возможные маркеры кальций-зависимых форм артериальной гипертензии // Тезисы докладов Второго международного конгресса «Артериальная гипертензия – от Короткова до наших дней». Т. 15 - Санкт-Петербург, 2009. С.52-53.

16. Чурина С.К., Ключева Н.З., Антонова О.С., Петрова Е.И., Демешко О.Н., Борисова И.Ю. Особенности формирования артериальной гипертензии при дефиците экзогенного кальция: роль паратиреоидного гипертензивного фактора.// Тезисы докладов Второго международного конгресса «Артериальная гипертензия – от Короткова до наших дней». Т. 15 - Санкт-Петербург, 2009. С. 116.

17. Антонова О.С., Корнева Н.А., Белов Ю.В., Курочкин В.Е. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (обзор) // Научное приборостроение - 2010. - Т. 20, №1. - С. 3 - 9.

18. Антонова О.С., Корнева Н.А., Цыганков А.М., Белов Ю.В., Варламов Д.А., Кюрджиев Ю.В., Чернышев А.В. Оценка двух принципиальных подходов к разработке системы автоматизированного выделения нуклеиновых кислот // Технологии живых систем - 2010. - Т. 7, №3. - С. 47 — 52.