

На правах рукописи

РЕДИНА ОЛЬГА ЕВГЕНЬЕВНА

**КОМПЛЕКСНОЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ
ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ НА МОДЕЛИ
СТРЕСС-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ -
КРЫСАХ ЛИНИИ НИСАГ**

03.02.07 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в лаборатории эволюционной генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Научный консультант **Маркель Аркадий Львович**, профессор, доктор биологических наук, заведующий лабораторией эволюционной генетики ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук

Официальные оппоненты **Гуляева Людмила Федоровна**, профессор, доктор биологических наук, заведующая лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза ФИЦ Фундаментальной и Трансляционной Медицины, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, г. Новосибирск

Зенкова Марина Аркадьевна, профессор, доктор биологических наук, заведующая лабораторией биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Кривошеков Сергей Георгиевич, профессор, доктор медицинских наук, заведующий отделом Функциональных резервов организма и спортивной медицины Научно-исследовательского института физиологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск

Ведущее учреждение ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН», Научно-исследовательский институт медицинской генетики, г. Томск

Защита диссертации состоится _____ года на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу: 630090 г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 10; тел.+7(383)363-49-06, факс: +7(383)333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФИЦ ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <http://www.bionet.nsc.ru>

Автореферат разослан « _____ » _____ 2020 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М.Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Распространенность артериальной гипертензии (АГ) в индустриально развитых странах составляет более 40% (Бойцов *и др.*, 2014) и число заболевших неуклонно увеличивается (Kearney *et al.*, 2005). АГ является основным фактором риска смерти от сердечно-сосудистых заболеваний (Чазова *и др.*, 2015). Значимая роль в развитии АГ отводится влиянию, как средовых факторов, так и генетически обусловленной предрасположенности к развитию болезни. Антигипертензивная терапия помогает стабилизировать уровень артериального давления (АД) и значительно уменьшать связанные с повышенным АД повреждения органов-мишеней. Однако, несмотря на множество имеющихся вариантов лечения, 13,7% пациентов имеют устойчивую АГ и неконтролируемое АД при использовании схем из 3-х и более антигипертензивных препаратов разных классов (Oparil & Schmieder, 2015; Benjamin *et al.*, 2017), что определяет потребность разработки новых лекарств для лечения АГ и сопутствующих заболеваний (сердечная недостаточность, хронические заболевания почек, сахарный диабет).

Основы генетической предрасположенности и механизмы развития АГ у пациентов могут быть различными. Изучение генетических механизмов развития АГ рассматривается как одна из приоритетных задач медицинской генетики. Решение этой задачи необходимо для определения новых молекулярных мишеней для терапии и/или профилактики АГ и разработки персонализированного подхода с целью повышения эффективности лечения.

Степень разработанности темы. Основные физиологические системы регуляции уровня АД у человека и млекопитающих известны (Cowley, 1992; Guyton, 1990; Lifton *et al.*, 2001), но молекулярно-генетические механизмы развития АГ остаются недостаточно изученными. Исследования на больших популяциях людей, показали наличие сложной полигенной детерминации заболевания (Levy *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009) и то, что каждый из участвующих генов, видимо, делает лишь небольшой вклад в патогенез АГ. При этом картина осложняется межгенными взаимодействиями и влиянием средовых факторов.

Для изучения генетической основы АГ в мире широко используются линии крыс и мышей, моделирующих либо спонтанно развивающуюся АГ, либо АГ, индуцированную различными факторами, такими как высокая концентрация соли в диете, эмоциональный стресс, гормональные воздействия. Большинство работ проводятся на линиях крыс со спонтанной гипертензией (SHR) и с соль-чувствительной гипертензией (SS). Результаты этих работ предполагают, что генетический контроль развития различных форм АГ имеет как общие черты, так и специфические для каждой модели животных. Однако, несмотря на прогресс в

области изучения молекулярно-генетических механизмов развития АГ, роль полиморфизмов и особенности функционирования генов при различных сценариях развития патологии изучены недостаточно.

У человека частой причиной развития АГ является эмоциональный стресс. Для изучения генетической предрасположенности организма к развитию АГ при психоэмоциональном напряжении наиболее подходящей моделью является линия крыс НИСАГ, моделирующая развитие наследуемой индуцируемой стрессом АГ. Линия крыс НИСАГ была создана в 1985 году в Институте цитологии и генетики СО РАН профессором А.Л. Маркелем (Маркель, 1985). С тех пор эта линия активно изучалась. Крысы НИСАГ были охарактеризованы по многим физиологическим и биохимическим параметрам. Были изучены и особенности экспрессии ряда генов, известных как молекулярно-генетические маркеры АГ, однако, систематическое полногеномное изучение особенностей генетического контроля уровня АД у крыс НИСАГ стало доступно только в последние два десятилетия, что связано с появлением метода генетического картирования полигенных признаков (QTL анализ) и развитием технологии секвенирования нового поколения. Результаты, полученные с использованием этих технологий, и легли в основу написания данной диссертационной работы.

Цели и задачи. Цель работы заключалась в выявлении молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе развития стресс-чувствительной формы артериальной гипертонии у крыс линии НИСАГ.

При постановке задач для достижения цели были выбраны методические подходы, позволяющие провести полногеномные исследования: а) картирование полигенных признаков с помощью QTL анализа, который позволяет определять генетические локусы, ассоциированные с фенотипическим проявлением изучаемых признаков; б) сравнительное полногеномное профилирование уровня транскрипции генов с помощью секвенирования транскриптомов (RNA-Seq), что позволяет выявлять дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) в экспериментальных и контрольных образцах тканей и находить специфические для изучаемых линий нуклеотидные замены (SNPs); в) для определения генов-кандидатов, вовлеченных в проявление полигенных признаков были выбраны математико-статистические методы и интегративный геномно-транскриптомный подход. Суть этого подхода состоит в объединении результатов картирования локусов количественных признаков и RNA-Seq анализа, что позволяет выявить ДЭГ в QTL, и находить среди них позиционные гены-кандидаты (Yagil *et al.*, 2005). Такой подход позволяет определять новые гены-кандидаты, вовлеченные в проявление полигенного признака. Соответственно, для достижения цели в настоящей работе были поставлены следующие задачи:

- 1) С использованием QTL анализа провести генетическое картирование фенотипических признаков, имеющих отношение к проявлению гипертензивного состояния крыс НИСАГ, учитывая возрастные изменения в процессе развития патологии;
- 2) У крыс НИСАГ и контрольных нормотензивных крыс линии Wistar Albino Glaxo (WAG) провести сравнительный анализ транскриптомов методом RNA-Seq в структурах мозга, в которых локализованы центры регуляции АД (ствол мозга и гипоталамус), и в периферических органах/тканях (надпочечники и почки), которые являются патогенетическими звеньями и мишенями при развитии АГ;
- 3) В проанализированных органах/тканях гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс WAG выявить дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ);
- 4) Провести функциональную аннотацию ДЭГ в проанализированных органах/тканях и описать основные биологические процессы и метаболические пути, которые могут оказывать влияние на формирование стресс-чувствительной АГ у крыс НИСАГ;
- 5) Сравнить полученные данные секвенирования транскриптомов крыс НИСАГ и WAG с имеющимися в международных базах данных последовательностями геномов линий крыс, моделирующих другие формы АГ, а также линий крыс, являющихся генетическими моделями других патологий. Выявить однонуклеотидные замены (SNPs), встречающиеся только у гипертензивных линий крыс, а также SNPs, специфические для стресс-чувствительной формы АГ, которую моделируют крысы линии НИСАГ;
- 6) Использовать результаты генетического картирования, функционального анализа ДЭГ и современные математико-статистические методы для определения генов-кандидатов, которые могут быть предложены в качестве потенциальных мишеней для профилактических мероприятий и терапевтического воздействия при лечении АГ.

Научная новизна работы. Работа проведена с использованием крыс линии НИСАГ, которая является уникальной экспериментальной моделью стресс-чувствительной формы АГ, что обеспечивает оригинальность всех полученных результатов. В настоящей работе:

- 1) впервые были получены результаты генетического картирования (QTL анализ) нескольких полигенных признаков, имеющих отношение к развитию гипертензивного статуса крыс НИСАГ. Анализ был выполнен в двух группах самцов гибридов F_2 (НИСАГ \times WAG) разного возраста (3-4-х мес. и 6-и мес.), что продемонстрировало различия генетического контроля стресс-чувствительной формы гипертонии на начальных и более поздних этапах развития заболевания.

При анализе обеих возрастных групп были найдены QTLs, ассоциированные с признаками: уровень АД в покое и при воздействии эмоционального стресса, прирост АД при стрессе, вес тела, абсолютные и относительные веса органов-мишеней (надпочечник, почки, сердце), концентрация кортикостерона в плазме крови в покое и при стрессе, прирост концентрации кортикостерона в плазме крови в покое и при стрессе. У животных в возрасте 6-и месяцев были также проанализированы признаки абсолютный и относительный вес селезенки. Многие из найденных локусов были описаны впервые.

2) Анализ транскриптомов в структурах мозга, в которых локализованы центры регуляции АД (ствол мозга и гипоталамус), и в периферических органах/тканях, которые включены в патогенез гипертонической болезни (почки и надпочечники), позволил впервые получить полные списки генов, дифференциально экспрессирующихся в пяти органах/тканях (ствол мозга, гипоталамус, надпочечник, корковое и мозговое вещество почек) гипертонизированных крыс НИСАГ и контрольных нормотонизированных крыс WAG.

3) Впервые на основании результатов анализа транскриптомов в пяти органах/тканях гипертонизированных крыс НИСАГ и нормотонизированных крыс WAG были выявлены многочисленные ДЭГ, ассоциированные с гипертоническим статусом крыс НИСАГ, а также сделано подробное описание основных биологических процессов и метаболических путей, которые могут быть вовлечены в процесс развития стресс-чувствительной АГ у крыс НИСАГ. С помощью методов многомерной статистики (PLS-DA, partial-least squares discriminant analysis) в каждой ткани были определены ДЭГ, ассоциированные с гипертонией и делающие максимальный вклад в межлинейные различия.

4) Впервые проведено сравнение данных секвенирования транскриптомов крыс НИСАГ и WAG с имеющимися в международных базах данных последовательностями геномов линий крыс, моделирующих другие формы АГ, а также линий крыс, являющихся генетическими моделями других патологий, и выявлены SNPs, встречающиеся только у гипертонизированных линий крыс, а также SNPs, специфические для стресс-чувствительной формы АГ, которую моделируют крысы линии НИСАГ.

5) Сравнение генотипов 12 гипертонизированных линий/сублиний крыс позволило сделать вывод о наличии высокой специфичности молекулярно-генетических механизмов развития разных форм АГ и о том, что артериальная гипертония является полиморфным заболеванием, не имеющим единой этиологии.

6) На основании результатов QTL анализа и анализа транскриптомов были выявлены новые позиционные гены-кандидаты для признаков АД в покое и прирост уровня АД при стрессе у крыс НИСАГ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая ценность выполненной работы состоит в том, что результаты, полученные при проведении генетического картирования и анализа транскриптомов, позволили:

а) выявить генетические локусы, ассоциированные с уровнем АД в покое и при стрессе, а также с признаками, сопровождающими развитие гипертензивного статуса крыс НИСАГ: вес тела, абсолютные и относительные веса органов-мишеней (надпочечники, почки, сердце, селезенка), концентрация кортикостерона в плазме крови в покое и при стрессе;

б) описать изменения генетического контроля анализируемых признаков в процессе взросления животных;

в) выявить гены, дифференциально экспрессирующиеся у гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс WAG в двух структурах мозга (ствол мозга и гипоталамус), в которых находятся центры регуляции уровня АД, а также в периферических органах (надпочечник, почки), связанных с патогенезом артериальной гипертензии;

г) выявить ДЭГ, ассоциированные с гипертензивным статусом крыс НИСАГ;

д) описать биологические процессы и метаболические пути, которые могут вносить вклад в развитие стресс-чувствительной формы АГ, моделируемой линией крыс НИСАГ;

е) выявить SNPs, специфические для гипертензивных крыс линии НИСАГ, по сравнению с линиями крыс, моделирующими другие формы гипертензии.

Практическая значимость работы выполненной работы состоит в следующем:

1. Картирование признаков, характеризующих гипертензивный фенотип крыс НИСАГ, показало в каких локусах присутствие аллелей крыс НИСАГ может увеличивать значение признака, а в каких локусах, наоборот, уменьшать значение признака. Эти данные полезны для выявления генов-кандидатов, ассоциированных с развитием патологии, либо с адаптивным ответом, направленным на восстановление гомеостаза.

2. Для ряда признаков, для которых невозможно напрямую оценить уровень экспрессии генов (например, АД в покое и АД при стрессе), удалось определить вспомогательные фенотипы, что в настоящей работе позволило выявить новые гены-кандидаты, участвующие в контроле фенотипического проявления этих признаков.

3. В результате выполненной работы собраны данные, позволяющие эффективно выявлять гены-кандидаты в локусах, ассоциированных с уровнем АД в покое и при стрессе, а также с признаками, сопровождающими развитие гипертензивного статуса крыс НИСАГ, таких как гипертрофия органов-мишеней (надпочечники,

почки, сердце), увеличение концентрации кортикостерона в плазме крови в покое и при стрессе.

4. Полученные данные являются полезным дополнением к результатам аналогичных работ, выполняемых в зарубежных лабораториях на линиях крыс и мышей, моделирующих другие формы АГ, и могут быть использованы для определения как общих, так и специфических молекулярных детерминант при изучении разных моделей АГ с целью определения потенциальных мишеней для терапии или профилактики гипертонической болезни, а также сопутствующих патологий.

Положения, выносимые на защиту

1) Фенотипические признаки, характеризующие гипертензивный статус крыс НИСАГ – (артериальное давление в покое и при стрессе), а также признаки, сопровождающие развитие их гипертензивного статуса - вес тела, абсолютный и относительный вес органов-мишеней (надпочечники, почки, сердце), концентрация кортикостерона в плазме крови в покое и при стрессе, имеют сложную архитектуру генетического контроля.

2) Генетический контроль артериального давления и связанных с ним признаков изменяется в процессе взросления и формирования гипертензивного статуса крыс НИСАГ.

3) Во всех пяти проанализированных органах/тканях - в структурах мозга (стволе мозга и гипоталамусе), имеющих центры регуляции артериального давления, а также в периферических органах/тканях (надпочечнике, корковом и мозговом веществе почек), которые являются основными звеньями патогенеза артериальной гипертонии, имеются многочисленные дифференциально экспрессирующиеся гены, ассоциированные с развитием гипертонии, а также дифференциально экспрессирующиеся гены, ассоциированные с ответом на различные стимулы и стресс и оказывающие компенсаторное действие, направленное на поддержание гомеостаза.

4) В генотипе крыс НИСАГ имеются многочисленные специфические для данной линии крыс нуклеотидные замены, что обеспечивает значительные отличия генотипа крыс НИСАГ от генотипов крыс других гипертензивных линий.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты работы опубликованы в 29 статьях в международных и отечественных журналах из списка ВАК (23 из них опубликованы в журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of Science). Две публикации - в сборниках статей и 53 публикации тезисов в материалах 35 Российских и международных конференций, включая четыре зарубежных специализированных конференции, работа которых была полностью посвящена проблемам, связанным с АГ.

Вклад автора. Все представленные в диссертационной работе экспериментальные результаты генетических исследований получены лично автором, либо при его непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов, в обработке данных, а также интерпретации, оформлении и публикации результатов. В большинстве публикаций фамилия автора диссертации стоит на первом или последнем месте, что отражает ведущую роль автора в выполнении представленных в диссертации работ.

Диссертационная работа, выполненная в ИЦиГ СО РАН в период с 1999 по 2019 гг., была поддержана грантами РФФИ (01-04-49695а, 05-04-48567а, 08-04-01048а) и РФФИ 14-15-00118, которыми руководил автор, а также несколькими бюджетными проектами. В работе использовалось оборудование Центров коллективного пользования ИЦиГ СО РАН: Центр генетических ресурсов лабораторных животных, ЦКП по синтезу олигонуклеотидов, Центр геномных исследований, а также Сибирский суперкомпьютерный центр СО РАН.

Автор выражает искреннюю благодарность коллегам, принимавшим участие в выполнении работ, представленных в диссертации, и являющихся соавторами полученных результатов и опубликованных статей: А.Л. Маркелю – руководителю лаборатории эволюционной генетики, в которой выполнялась работа, и научному консультанту данной диссертационной работы. Группой Аркадия Львовича были получены и фенотипически охарактеризованы самцы гибриды F_2 (НИСАГхWAG), что создало основу для проведения генетического картирования фенотипических признаков с помощью QTL анализа. Махановой Н.А. – за проведение работы по характеристике фенотипических признаков самцов гибридов F_2 (НИСАГхWAG). Смоленской С.Э. – за сотрудничество при проведении генотипирования крыс F_2 (НИСАГхWAG), а также за критическое обсуждение результатов в процессе подготовки публикаций к печати. Ершову Н.И. – за биоинформатическое сопровождение работ по анализу данных RNA-Seq. Дымшицу Г.М. и молодым сотрудникам его лаборатории – за помощь на начальных этапах работы и за участие в сборе образцов печени для выделения ДНК для проведения QTL анализа. Масловой Л.Н. - за измерение концентрации кортикостерона в плазме крови экспериментальных животных. Мазуру А.М. – сотруднику ЗАО Геноаналитика (Москва, РФ) за помощь в проведении RNA-Seq анализа. Ефимову В.М. – за помощь в использовании методов многомерной статистики. Сотрудникам лаборатории эволюционной генетики ИЦиГ СО РАН Абрамовой Т.О., Федосеевой Л.А., Рязановой М.А., Климову Л.О. за участие в выполнении экспериментального подтверждения уровня дифференциальной транскрипции генов методом ПЦР с детекцией в реальном времени.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 485 страницах машинописного текста и содержит 46 таблиц и 55 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, трех глав, в каждой из которых представлены результаты и их обсуждение, выводов и списка цитируемой литературы, в который входит 725 ссылок, включая 50 ссылок на отечественные работы, а также приложение, состоящее из 6 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В работе использовали гипертензивных крыс линии НИСАГ/Исгн с наследуемой индуцируемой стрессом артериальной гипертонией и нормотензивных крыс линии WAG/GSto-Исгн (Wistar Albino Glaxo). Работа выполнена на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, РФ. Крыс содержали в стандартных условиях, воду и сбалансированный корм давали без ограничения. Измерение уровня АД проводили непрямым методом (tail-cuff method) с использованием оборудования фирмы Elema Schonender (Швеция) в одно и то же время суток. Базальный уровень АД измеряли под кратковременным эфирным наркозом для предотвращения психологического стресса от процедуры измерения. Рестрикционный стресс проводили, помещая крысу в тесную проволочную клетку-цилиндр на 30 мин. Уровень АД сразу после стрессирования измеряли без наркоза. Эксперименты выполнялись в соответствии с Международными правилами проведения работ с экспериментальными животными и одобрены биоэтическим комитетом ИЦиГ СО РАН.

QTL анализ проведен в двух группах самцов гибридов F_2 (НИСАГ \times WAG): в возрасте 3-4-х месяцев (n=103) и 6-и месяцев (n=126). В обеих группах анализировали признаки: АД в покое, мм.рт.ст.; АД при стрессе, мм.рт.ст.; прирост уровня АД при стрессе относительно покоя, мм.рт.ст.; вес тела, г; вес надпочечников, мг; относительный вес надпочечников, мг/100 г веса тела; вес почек, г; относительный вес почек, г/100 г веса тела; вес сердца, г; относительный вес сердца, г/100 г веса тела; концентрация кортикостерона в плазме крови в покое, мкг/100 мл; концентрация кортикостерона в плазме крови при стрессе, мкг/100 мл; прирост концентрации кортикостерона в плазме крови при стрессе, мкг/100 мл. Крысы F_2 (НИСАГ \times WAG) в возрасте 6-и месяцев были проанализированы по дополнительным признакам: вес селезенки, г и относительный вес селезенки, г/100 г веса тела. Межлинейные различия длин микросателлитных повторов определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на геномной ДНК, выделенной из печени. QTL анализ генома крыс F_2 (НИСАГ \times WAG) в возрасте 3-4-х мес. и 6-и мес. проведен с помощью 145 и 149 полиморфных микросателлитных маркеров, соответственно. Положение

маркеров на хромосомах определялось по базе данных RGSC Genome Assembly v 5.0. Их список и последовательности праймеров даны на сайте <http://icg.nsc.ru/isiah/en/category/qtl/>, описывающем линию крыс НИСАГ.

Анализ сцепления проводили с помощью программ MAPMAKER/EXP 3.0 и MAPMAKER/QTL 1.1 (Lander *et al.*, 1987). Расчет пороговых значений достоверности LOD-балла проводили в программе QTL Cartographer Version 1.17, JZmapqtl (statgen.ncsu.edu) (Basten *et al.*, 2004). Для расчета уровня статистической значимости использовали пермутационный тест с репликацией случайных перестановок экспериментальных данных 1000 раз. Сцепление считали достоверным, если экспериментально полученный LOD-балл превышал пороговое значение при анализе генома (experiment-wise threshold) ($p < 0.05$) (Lander & Kruglyak, 1995). Сцепление считали вероятным, если экспериментально полученный LOD-балл превышал пороговое значение при анализе отдельно взятой хромосомы (chromosome-wise threshold) ($p < 0.05$). Статистическую обработку результатов проводили с помощью Statistica 6.0 (StatSoft, Tulsa, USA). Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Сравнение найденных QTL с локусами, описанными при изучении других линий крыс, проводили в базе данных Rat Genome Database (RGD, <http://rgd.mcw.edu/>).

Концентрацию кортикостерона в плазме крови в покое и при стрессе измеряли методом конкурентного белкового связывания в модификации А.А. Тинникова и Н.М. Бажан (Тинников & Бажан, 1984).

Секвенирование транскриптомов (RNA-Seq) в органах/тканях самцов НИСАГ ($n=3$) и WAG ($n=3$) в возрасте 3-х месяцев проводили в стволе мозга (продолговатый мозг и мост), гипоталамусе, надпочечнике, корковом и мозговом веществе почек. Образцы тканей в RNAlater пересылали в ЗАО Геноаналитика (Москва, РФ), где проводили пробоподготовку и RNA-Seq анализ. Все образцы анализировались как биологические повторы. Фракцию мРНК получали из общей РНК с помощью Dynabeads mRNA Purification Kit (Ambion, USA) согласно протоколу к набору. кДНК библиотеки получали с помощью NEBNext mRNA Library Prep Reagent Set for Illumina (NEB, USA). Секвенирование проводили на платформе Illumina HiSeq1500 с глубиной прочтения более 10 млн. ридов, с длиной прочтения 50 оснований с одного конца. Данные картировали на референсный геном (Rnor_5.0\rn5), с помощью программы TopHat2. Аннотацию генов проводили в базе данных NCBI Gene. Качество картированных данных оценивали с помощью модуля 'CollectRnaSeqMetrics' в Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>).

Определение ДЭГ проводили в пакете программ Cufflinks/Cuffdiff. Гены считали дифференциально экспрессирующимися в сравниваемых образцах тканей

при $q \text{ value} < 5\%$. Данные RNA-Seq депонированы в базу данных Short Read Archive NCBI с номером доступа: PRJNA299102. Списки ДЭГ даны на сайте <http://icg.nsc.ru/isiah/category/rnaseq/>. Функциональная аннотация ДЭГ проводилась в базе данных DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), где использовали опции Gene Ontology для определения наиболее обогащенных терминов биологических процессов. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway Database (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>) использовали для выявления метаболических путей с участием ДЭГ, а Rat Genome Database (RGD, <http://rgd.mcw.edu/>) - для определения ДЭГ, ассоциированных с гипертензией и сопровождающими ее развитие заболеваниями.

Выявление SNPs. Из данных RNA-Seq для 5 различных органов/тканей каждого животного (гипоталамус, ствол мозга, надпочечник, мозговое и корковое вещество почки) в формате bam в пакете программ Picard были удалены потенциальные ПЦР-дубликаты модулем 'MarkDuplicates', после чего данные были объединены в один пул для каждого животного модулем 'MergeSamFiles'. Определение SNPs проводилось относительно генома крыс BN/NhsdMcwi в сборке версии RGSC5.0. Исходный набор SNPs определяли с помощью пакета программ GATK (Genome Analysis Toolkit) с использованием модуля 'HaplotypeCaller' в режиме 'GVCF' и модуля 'GenotypeGVCFs' для объединенного генотипирования, с фильтрацией недостоверных позиций. SNPs были далее отфильтрованы по критериям: генотип должен быть установлен хотя бы для 3-х животных в каждой из экспериментальных групп. Генотип НИСАГ должен быть гомозиготным по альтернативному аллелю (Alt1/Alt1) во всех образцах, а генотип WAG не должен содержать этого аллеля во всех образцах. Покрытие генотипа Alt1/Alt1 составляло ≥ 10 хотя бы у одного из крыс НИСАГ. Классификацию эффектов SNPs проводили в программе SnpEff (http://snpeff.sourceforge.net/SnpEff_manual.html). Эффекты замены аминокислот на функцию белка оценивали в программе SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>).

Сравнение SNPs крыс НИСАГ и WAG с генотипами других линий проводили с использованием данных базы RGSC для последовательностей геномов 42 линий и сублиний крыс: FHH/EurMcwi, LH/MavRrrc, MHS/Gib, SBH/Ygl, SHR/OlaIpcv, SHRSP/Gla, SHR/NCrIPrin, SHR/NHsd, SHR/OlaIpcvPrin, SS/Jr, SS/JrHsdMcwi, FHL/EurMcwi, LN/MavRrrc, LL/MavRrrc, MNS/Gib, SBN/Ygl, SR/Jr, WKY/N, WKY/Gla, WKY/NCrI, WKY/NHsd, ACI/N, ACI/EurMcwi, BBDP/Wor, BN-Lx/Cub, BN-Lx/CubPrin, BN/SsN, BUF/N, DA/BklArbNsi, F334/N, F344/NHsd, F344/NCrI, SUO_F344, GK/Ox, LE/Stm (SOLiD), LEW/CrI, LEW/NCrIBR, LE/Stm (Illumina), M520/N, MR/N, WAG/Rij, WN/N (Hermsen *et al.*, 2015). Сравнение с генотипами 42-х линий и сублиний проводилось только по

геномным локусам, секвенированным в проведенном нами транскриптомном анализе крыс НИСАГ и WAG.

Для оценки вклада ДЭГ в межлинейные различия данные экспрессии генов (в RPKM) были логарифмированы, центрированы и нормализованы, затем шкалированы (principal coordinates method) с использованием евклидовых метрических расстояний, проведен PLS-DA (partial least squares discriminant analysis) анализ (Barker & Rayens, 2003) и построены оси, максимизирующие расстояние между крысами НИСАГ и WAG. Далее корреляционный анализ между экспрессией генов и координатами крыс вдоль первой функционально значимой синтетической оси PLS-DA выявил гены, с максимальными значениями коэффициента корреляции, которые считали генами, в наибольшей степени способствующими проявлению межлинейных различий.

ПЦР с детекцией в реальном времени (qPCR). Для выделения суммарной РНК и её обработки ДНКазой использовали набор SV Total RNA Isolation system (Promega, USA), либо TRI-reagent (MRC, USA) с очисткой РНК от примесей геномной ДНК с помощью DNase I (Promega, USA). В реакции обратной транскрипции использовали случайные нонануклеотидные праймеры и обратную транскриптазу MoMLV (Вектор-Бест, РФ). qPCR проводили, как описано в (Ginzinger, 2002) на амплификаторе iQ5 (Bio-Rad Laboratories, USA) с SYBR Green I. *Rpl30* (ribosomal protein L30), *Ppia* (peptidylprolyl isomerase A), либо *Gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) использовали как гены сравнения. Для статистической обработки использовали U-тест Манна-Уитни, либо Student's *t*-test. Данные представляли как средние арифметические и их ошибки ($M \pm SEM$), уровень экспрессии генов у крыс WAG принимали за 100%.

Сравнительное измерение концентрации эпоксидгидролазы (sEH) в мозговом веществе почек крыс НИСАГ и WAG проводили у крыс в возрасте 3-х и 6-и месяцев методом иммуноферментного анализа с помощью Rat Epoxide hydrolase 2 ELISA Kit Cat.# MBS7235941 (MyBioSource, США). Использовали планшетный ридер MultiskanEX (Thermo Labsystem, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

QTL анализ. Крысы НИСАГ по сравнению с контрольными крысами WAG характеризуются генетически детерминированным повышением активности симпатoadреналовой и гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной систем и имеют характерные для АГ изменения морфометрических показателей ряда органов-мишеней. Межлинейные различия по изучаемым в работе признакам показаны в Таблице 1. Характеристики крыс гибридов приводятся в Таблице 2.

Таблица 1. Характеристика взрослых (6 мес.) крыс линий НИСАГ и WAG

Признак	НИСАГ	WAG
	М ± m (n=10)	М ± m (n=14)
Систолическое АД в покое, мм.рт.ст.	175.0 ± 4.8*** ^{xxx}	135.0 ± 3.4
Систолическое АД при стрессе, мм.рт.ст.	215.0 ± 5.9***	140.0 ± 5.1
Вес тела, г	302.0 ± 4.52	310.0 ± 5.03
Вес надпочечников, мг	52.9 ± 1.5***	43.4 ± 0.8
Вес надпочечников/вес тела, мг/100г вт.	17.5 ± 0.5***	14.0 ± 0.3
Вес почек, г	2.11 ± 0.03***	1.62 ± 0.03
Вес почек/вес тела, г/100г вт.	0.70 ± 0.01***	0.52 ± 0.01
Вес сердца, г	1.10 ± 0.02*	1.01 ± 0.03
Вес сердца/вес тела, г/100г вт.	0.363 ± 0.007**	0.327 ± 0.009
Конц. кортикостерона в плазме в покое, мкг/100 мл	5.4 ± 1.64* ^{xxx}	1.4 ± 0.28 ^{xxx}
Конц. кортикостерона при стрессе, мкг/100 мл	32.1 ± 2.2	31.0 ± 0.8
Прирост конц. кортикостерона при стрессе, мкг/100 мл	27.1 ± 2.28	29.6 ± 0.9

*- p< 0.05; **- p< 0.01; ***- p< 0.001 у НИСАГ по сравнению с WAG (Student's t-test);

^{xxx}- p< 0.001 по сравнению со стрессом.

Таблица 2. Сравнение признаков в группах самцов гибридов F₂(НИСАГxWAG)

Признак	F ₂ (3-4 мес.)	F ₂ (6 мес.)
	М ± m (n=103)	М ± m (n=126)
Систолическое АД в покое, мм.рт.ст.	159 ± 1.6** ^{xxx}	164.6 ± 1.6 ^{xx}
Систолическое АД при стрессе, мм.рт.ст.	190.9 ± 1.9***	172.4 ± 1.8
Прирост АД при стрессе, мм.рт.ст.	32.1 ± 2.0***	7.5 ± 1.9
Вес тела, г	253.3 ± 4.0***	297.0 ± 3.7
Вес надпочечников, мг	36.0 ± 0.5***	39.4 ± 0.5
Вес надпочечников/вес тела, мг/100г вт.	14.5 ± 0.3**	13.4 ± 0.2
Вес почек, г	1.5 ± 0.02***	1.9 ± 0.03
Вес почек/вес тела, г/100г вт.	0.61 ± 0.01	0.63 ± 0.005
Вес сердца, г	0.95 ± 0.01***	1.09 ± 0.01
Вес сердца/вес тела, г/100г вт.	0.38 ± 0.005	0.37 ± 0.003
Вес селезенки, г	-	0.68 ± 0.016
Вес селезенки/вес тела, г/100г вт.	-	0.22 ± 0.005
Конц. кортикостерона в плазме в покое, мкг/100 мл	3.3 ± 0.34** ^{xxx}	2.07 ± 0.2 ^{xxx}
Конц. кортикостерона в плазме при стрессе, мкг/100 мл	31.8 ± 0.55***	25.3 ± 0.9
Прирост конц. кортикостерона при стрессе, мкг/100 мл	28.4 ± 0.65***	23.4 ± 0.9

** - p< 0.01; *** - p< 0.001 при сравнении F₂ в возрасте 3-4 мес. и F₂ в возрасте 6 мес.;

^{xx} - p< 0.01; ^{xxx} - p< 0.001 по сравнению со стрессом (Student's t-test).

Результаты QTL анализа в группе крыс F₂(НИСАГxWAG) в возрасте 3-4-х месяцев. QTLs, статистически высокодостоверно ассоциированные с изучаемыми признаками, даны в Таблице 3. Для признаков АД в покое, АД при стрессе и прирост АД при стрессе в этой возрастной группе крыс были найдены только статистически вероятные ассоциации (Таблица 4). Несколько QTLs были описаны нами впервые.

Таблица 3. QTLs, статистически высокодостоверно ассоциированные с признаками самцов гибридов F₂ (НИСАГ x WAG) в возрасте 3-4-х месяцев

хромосома, маркер в пике локуса	Протяженность локуса в мегабазах, название QTL в RGD	LOD балл	P experiment-wise	Перекрывается с QTL для того же признака у других линий крыс: линия, ссылка
вес тела				
1, D1Rat76	244-272.2, Bw80 (Body weight QTL 80)	3.25	0.025	Много локусов http://rgd.mcw.edu/
In относительный вес почек				
1, D1Rat117	202-258, Kidm44 (Kidney mass QTL 44)	3.42	0.025	HTG, (Ueno <i>et al.</i> , 2003) PD, (Seda <i>et al.</i> , 2005)
7, D7Rat150	30-54, Kidm45 (Kidney mass QTL 45)	3.95	0.01	novel
12, D12Rat93	24-42, Kidm46 (Kidney mass QTL 46)	3.79	0.01	novel
In концентрация кортикостерона в плазме крови при стрессе				
2, D2Rat157	202-236	3.15	0.05	F344, (Solberg <i>et al.</i> , 2006)

Таблица 4. QTLs, статистически вероятно ассоциированные с признаками уровня АД, в группе самцов гибридов F₂ (НИСАГ x WAG) в возрасте 3-4-х месяцев

Хромосома, маркер в пике локуса	Протяженность локуса в мегабазах	LOD балл	P chromosome-wise	Перекрывается с QTL для того же признака у других линий крыс: линия, ссылка
АД в покое				
11, D11Rat7	38-62	2.26	0.01	SS, (Herrera <i>et al.</i> , 2006) SHR, (Stoll <i>et al.</i> , 2000)
20, D20Rat47-D20Rat30	0-22	1.96	0.025	SS, (Moreno <i>et al.</i> , 2003)
АД при стрессе				
8, D8Rat53-D8Rat149	0-68	1.84	0.05	novel
9, D9Rat100	90-121.4	2.31	0.01	SS, (Moreno <i>et al.</i> , 2003)
10, D10Rat43	14-42	2.19	0.025	novel
18, D18Rat1	68-86.3	1.67	0.05	SS, (Cowley <i>et al.</i> , 2000)
прирост АД при стрессе				
11, D11Rat38-D11Rat50	54-93.5	2.25	0.01	SS, (Moreno <i>et al.</i> , 2003)
15, D15Rat29	104-114.5	2.11	0.025	novel
17, D17Rat107	0-24	2.05	0.025	novel
X, DXRat93-DXRat34	42-118	2.30	0.025	novel

Эффекты аллелей в QTLs показаны в Таблице 5. Присутствие аллелей НИСАГ в локусе на хромосоме 1 ассоциировано со снижением веса тела. В QTLs, ассоциированных с относительным весом почек, аллели крыс НИСАГ оказывают разные эффекты на значение признака, а присутствие аллелей крыс НИСАГ в QTL на хромосоме 2 ассоциировано с увеличением концентрации кортикостерона в плазме крови при стрессе.

Таблица 5. Эффекты аллелей в QTLs

значение признака у крыс F ₂ , n	хромосома, маркер (мегабазы)	значение признака (M ± SEM) у крыс с генотипом		
		H/H n	H/W n	W/W n
вес тела				
254.3 ± 3.5 101	1, D1Rat76 (252.2)	235.0 ± 7.8*** 23	255.3 ± 4.4 55	271.1 ± 6.8 23
относительный вес почек				
0.599 ± 0.006 101	1, D1Rat117 (240.6)	0.624 ± 0.009*** 27	0.599 ± 0.007 52	0.566 ± 0.010 22
	7, D7Rat150 (36.6)	0.576 ± 0.006*** 43	0.606 ± 0.009 44	0.647 ± 0.018 13
	12, D12Rat93 (34.2)	0.567 ± 0.008*** 24	0.596 ± 0.009 48	0.629 ± 0.009 28
концентрация кортикостерона в плазме крови при стрессе				
31.82 ± 0.57 103	2, D2Rat157 (215.3)	33.25 ± 1.26* 25	32.39 ± 0.68 51	29.41 ± 1.20 27
АД в покое				
159.1 ± 1.7 101	11, D11Rat7 (51.1)	157.1 ± 2.7* 26	156.3 ± 2.2 55	169.5 ± 4.1†† 20
	20, D20Rat47-D20Rat30 (4.1-24.0)	163.1 ± 3.9 26	154.8 ± 2.1 52	164.4 ± 3.1† 23
АД при стрессе				
190.4 ± 1.9 101	8, D8Rat53-D8Rat149 (21.9-58.3)	196.0 ± 3.7* 30	190.2 ± 2.4 45	184.0 ± 4.2 26
	9, D9Rat100 (101.2)	186.6 ± 4.0* 25	187.5 ± 2.2 53	201.1 ± 4.8 23
	10, D10Rat43 (22.3)	194.6 ± 3.7† 28	183.6 ± 2.5 44	196.4 ± 3.8†† 29
	18, D18Rat1 (86.1)	198.1 ± 3.9** 31	188.8 ± 3.0 40	184.8 ± 2.9 29
прирост АД при стрессе				
31.2 ± 2.0 101	11, D11Rat38-D11Rat50 (66.3-90.1)	34.5 ± 3.2* 29	33.7 ± 2.7 51	20.7 ± 4.5† 21
	15, D15Rat29 (113.1)	37.9 ± 4.9** 17	34.4 ± 2.6 54	21.8 ± 3.3†† 30
	17, D17Rat107 (11.8)	36.1 ± 3.6† 28	26.2 ± 2.4 54	40.0 ± 5.2† 18
	X, DXRat93 - DXRat34 (88.6-101.5)	38.2 ± 3.0** 44		25.9 ± 2.4 57

H/H – гомозигота по аллелям крыс НИСАГ; W/W – гомозигота по аллелям крыс WAG; H/W – гетерозигота; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 – по сравнению с W/W; † p < 0.05, †† p < 0.01 – по сравнению с H/W;

В QTLs, статистически вероятно ассоциированных с признаками, связанными с уровнем АД, присутствие аллелей крыс НИСАГ в локусе на хромосоме 11

приводит к снижению уровня АД в покое. В двух QTLs, ассоциированных с уровнем АД при стрессе, в присутствии аллелей крыс НИСАГ значение признака увеличивается, а в локусе на хромосоме 9 значение признака снижается. В трех локусах (на хромосомах 11, 15 и X), ассоциированных с признаком прирост уровня АД при стрессе, присутствие аллелей крыс НИСАГ приводит к статистически достоверному увеличению значения признака. Именно в этих локусах могут находиться гены, которые являлись ключевыми в процессе селекции крыс НИСАГ по признаку повышения уровня АД в ответ на воздействие стресса. Со всеми остальными указанными в Таблице 2 признаками были найдены статистически вероятные ассоциации (см. текст диссертации).

Результаты QTL анализа в группе крыс F₂(НИСАГxWAG) в возрасте 6-и месяцев. QTLs, охарактеризованные статистически высокодостоверными ассоциациями с признаками, даны в Таблице 6. Почти все локусы были нами описаны впервые. Статистически вероятные ассоциации были найдены для всех указанных в Таблице 2 признаков (см. текст диссертации).

Таблица 6. QTLs, статистически высокодостоверно ассоциированные с признаками самцов гибридов F₂ (НИСАГ x WAG) в возрасте 6-и месяцев

хромосома, маркер в пике локуса	Протяженность локуса в мегабазах, название QTL в RGD	LOD балл	P experiment-wise	Перекрывается с QTL для того же признака у других линий крыс, ссылка
АД в покое				
1, D1Rat168-D1Rat76	190 – 274, Bp306 Blood pressure QTL 306	3.44	0.025	30 QTLs http://rgd.mcw.edu/
АД при стрессе				
1, D1Rat168	194 – 250, Bp307 Blood pressure QTL 307	3.06	0.05	novel
вес тела				
15, D15Rat80	12-40	2.76	0.05	LEW, (Bonné <i>et al.</i> , 2002)
X, DXRat104	134-156, Bw174 Body weight QTL 174	3.17	0.025	novel
вес надпочечников				
6, D6Rat66	114-138, Gmadr3 Adrenal mass QTL 3	3.68	0.01	novel
относительный вес надпочечников				
4, D4Rat136	0-30	3.64	0.01	novel
относительный вес селезенки				
1, D1Rat168	188-260	3.23	0.025	novel
In концентрация кортикостерона в плазме крови при стрессе				
9, D9Rat55	48-92, Srcrt7 Stress Responsive Cort QTL 7	3.33	0.025	novel
19, D19Rat28	0-18, Srcrt9 Stress Responsive Cort QTL 9	2.89	0.05	novel

Эффекты аллелей крыс НИСАГ и WAG в локусах показаны в Таблице 7. В отличие от молодой группы животных, у крыс в возрасте 6-и месяцев присутствие аллелей крыс НИСАГ в QTLs, ассоциированных с уровнем АД в покое, а также с весом тела, приводит к увеличению значения этих признаков.

Таблица 7. Эффекты аллелей в QTLs в группе крыс F₂(НИСАГxWAG) в возрасте 6-и месяцев

значение признака у самцов F ₂ , n	хромосома, маркер (мегабазы)	Значение признака (M ± SEM) у крыс с генотипом		
		H/H n	H/W n	W/W n
АД в покое				
164.4 ± 1.6 125	1, D1Rat168 (224.2)	175.5 ± 3.8** 28	161.3 ± 2.0 64	160.9 ± 3.0 33
	1, D1Rat76 (252.2)	173.8 ± 3.3*** 32	163.7 ± 2.2 55	157.5 ± 2.8 38
АД при стрессе				
172.2 ± 1.8 122	1, D1Rat168 (224.2)	182.6 ± 4.6** 27	171.8 ± 2.0 63	164.2 ± 3.6 32
вес тела				
297.0 ± 3.7 126	15, D15Rat80 (30.3)	317.0 ± 7.4** 32	292.3 ± 5.1 66	285.4 ± 6.7 28
	X, DXRat104 (141.3)	308.9 ± 5.1*** 69		282.7 ± 4.9 57
вес надпочечников				
39.42 ± 0.52 126	6, D6Rat66 (121.4)	40.12 ± 0.90** 34	40.70 ± 0.72 63	35.83 ± 0.98 29
относительный вес надпочечников				
13.43 ± 0.19 126	4, D4Rat136 (9.7)	13.36 ± 0.32 [†] 8	14.26 ± 0.27 49	12.83 ± 0.27 ^{†††} 68
относительный вес селезенки				
0.219 ± 0.003 101	1, D1Rat168 (224.2)	0.206 ± 0.006*** 24	0.215 ± 0.005 49	0.238 ± 0.007 ^{††} 28
концентрация кортикостерона в плазме крови при стрессе				
25.36 ± 0.89 124	9, D9Rat55 (77.7)	22.02 ± 1.53 ^{††} 29	28.25 ± 1.27 65	22.35 ± 1.64 ^{††} 30
	19, D19Rat28 (5.1)	24.33 ± 1.42 37	28.01 ± 1.39 55	20.66 ± 1.58 ^{†††} 27

H/H – гомозигота по аллелям крыс НИСАГ; W/W – гомозигота по аллелям крыс WAG; H/W – гетерозигота; ** p < 0.01, *** p < 0.001 - по сравнению с W/W; [†] p < 0.05, ^{††} p < 0.01, ^{†††} p < 0.001 – по сравнению с H/W;

Результаты QTL анализа показали, что а) генетический контроль изучаемых признаков у крыс F₂(НИСАГxWAG) в возрасте 6-и месяцев значительно отличается от генетического контроля тех же признаков в группе более молодых животных; б) генетический контроль изучаемых признаков у крыс НИСАГ может

частично совпадать с генетическим контролем этих же признаков у других линий крыс. Однако мы нашли значительное число QTLs, которые были описаны нами впервые. В этих участках генома крыс НИСАГ могут находиться специфические генетические факторы, влияние которых отличает стресс-чувствительную форму АД от других форм заболевания.

Изменения генетического контроля полигенных признаков при взрослении животных были описаны и ранее, например, при генетическом картировании признаков, ассоциированных с липидным спектром в плазме крови крыс, полученных при скрещивании крыс SHR и крыс BB со спонтанно развивающимся диабетом (Kovacs *et al.*, 1998). У группы крыс F1(SxSHR)xS, содержащихся на низкосолевой диете, также было показано, что статистическая значимость большей части найденных локусов, ассоциированных с альбуминурией, значительно изменяется при взрослении животных (Garrett *et al.*, 2003). Сообщения о том, что контроль фенотипа может осуществляться различными генетическими локусами в разном возрасте, можно найти и в ряде других работ (Garrett *et al.*, 2003; Kovacs *et al.*, 1998; Samani *et al.*, 1996). Наши данные полностью согласуются с этими представлениями.

QTLs, общие для двух и более признаков. Сложность поиска генов-кандидатов для таких признаков как, например, уровень АД, связана с невозможностью измерить уровень экспрессии генов напрямую. В таких случаях исследователи стараются найти признаки, которые могут служить как вспомогательный фенотип, т.е. признаки, которые имеют отношение к проявлению изучаемого признака и картируются в те же генетические районы, что и сам признак (Bilusic *et al.*, 2004; Ways *et al.*, 2007). Такие QTLs, общие для двух и более признаков, могут содержать тесно сцепленные гены, контролирующие проявление изучаемых признаков, либо гены с плейотропным эффектом на признаки, контролируемые общим QTL. Использование вспомогательных фенотипов значительно повышает вероятность выявления искомых генов (Jacob & Kwitek, 2002).

В нашей работе в обеих возрастных группах крыс F₂(НИСАГxWAG) были найдены локусы, общие для признаков, характеризующих уровень АД (АД в покое, АД при стрессе, прирост АД при стрессе) и других признаков, ассоциированных с гипертензивным фенотипом крыс НИСАГ (Рисунки 1 и 2).

В группе крыс F₂(НИСАГxWAG) в возрасте 3-4-х месяцев локус, наиболее статистически значимо ассоциированный с признаком АД в покое на хромосоме 11, был также ассоциирован с признаком относительный вес почек (Рисунок 1А). Этот локус практически совпадает с локусом, который был ассоциирован с уровнем АД у крыс SS с соль-чувствительной гипертонией, и в котором также как

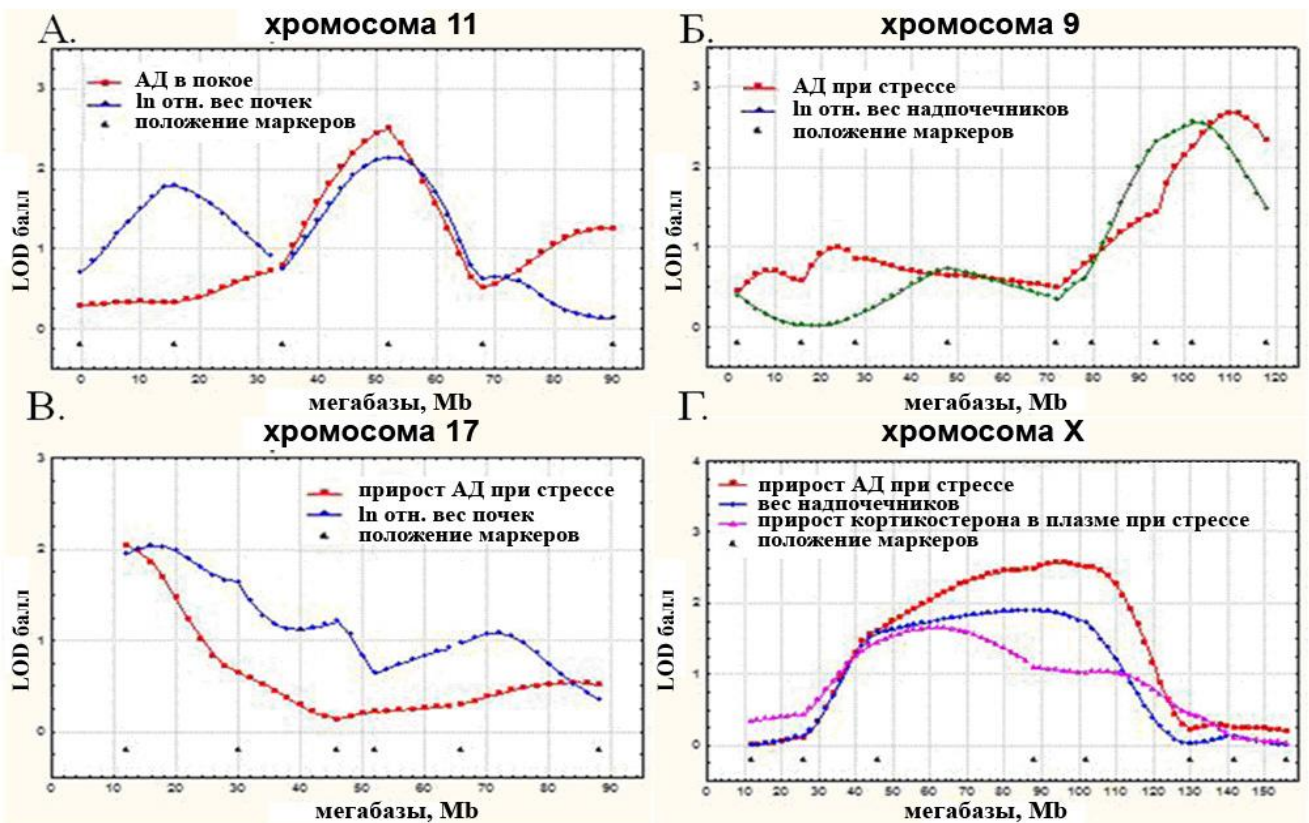


Рисунок 1. Общие QTLs в группе крыс F_2 (НИСАГ \times WAG) в возрасте 3-4-х месяцев

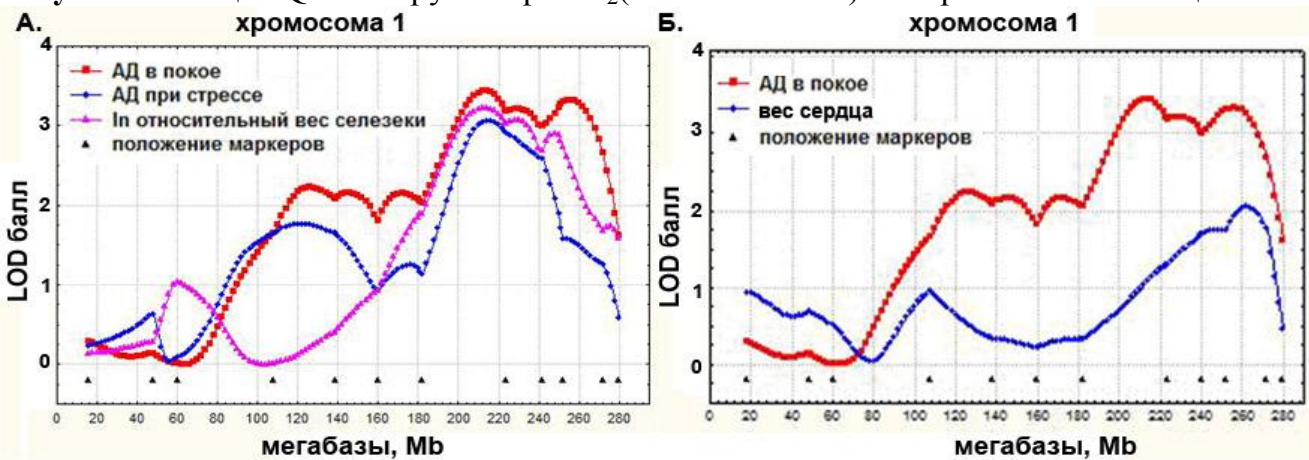


Рисунок 2. Общие QTLs в группе крыс F_2 (НИСАГ \times WAG) в возрасте 6-и месяцев

и у крыс НИСАГ присутствие аллелей крыс SS было ассоциировано со снижением уровня АД (Herrera *et al.*, 2006). На хромосоме 9 был найден общий локус для признаков АД при стрессе и относительный вес надпочечников (Рисунок 1Б). Присутствие аллелей крыс НИСАГ в локусе хромосомы 9 ассоциировано со снижением значений обоих признаков. Локусы, ассоциированные с приростом АД при стрессе, перекрываются с локусом, ассоциированным с относительным весом почек на хромосоме 17 и с весом надпочечников и приростом концентрации кортикостерона в плазме крови при стрессе на хромосоме X (Рисунок 1В-Г). В QTL на хромосоме X все три признака (прирост АД при стрессе, вес надпочечников и прирост концентрации

кортикостерона в плазме крови при стрессе) имеют более высокие значения в присутствии аллеля крыс НИСАГ.

В группе крыс F_2 (НИСАГ \times WAG) в возрасте 6-и месяцев в дистальной части хромосомы 1 были найдены два общих QTLs, один из которых ассоциирован с АД в покое, с АД при стрессе и с относительным весом селезенки (Рисунок 2А), а второй был общим для признаков АД в покое и вес сердца (Рисунок 2Б). У крыс, гомозиготных по аллелям НИСАГ в локусе, показанном на Рисунке 2А, уровень АД был достоверно выше как в покое, так и при стрессе, а относительный вес селезенки был достоверно ниже, чем у крыс, имеющих в данном локусе аллели WAG. В локусе, показанном на Рисунке 2Б, у крыс F_2 (НИСАГ \times WAG), имеющих в данном локусе два аллеля крыс НИСАГ, наблюдали скоординированное увеличение, как уровня АД, так и веса сердца.

Таким образом, мы нашли общие локусы, в которых признаки весовых характеристик органов-мишеней могут служить вспомогательным фенотипом для определения генов-кандидатов для признаков АД. Перекрытие локусов, ассоциированных с признаками АД с локусами весовых характеристик органов-мишеней объясняет наличие генетического сцепления величин АД и сопровождающих развитие гипертонии признаков, связанных с изменениями весовых параметров почек, сердца, надпочечников и селезенки у крыс НИСАГ.

Сравнительный анализ транскриптомов проводили у крыс НИСАГ и WAG в возрасте 3-х месяцев. Анализ животных такого возраста представляет особый интерес, так как выше нами было показано, что у крыс F_2 (НИСАГ \times WAG) в возрасте 3-4-х месяцев было найдено несколько локусов, ассоциированных с приростом уровня АД при воздействии рестрикционного стресса, т.е. с основным признаком, по которому проводилась селекция крыс НИСАГ. Соответственно, анализ транскриптомов органов-мишеней у крыс НИСАГ именно этой возрастной категории может наиболее точно охарактеризовать картину сопряженных с селекцией изменений в уровне транскрипции генов у стресс-чувствительного организма при развитии генетически обусловленной АГ.

Для анализа были выбраны ствол мозга и гипоталамус, в которых находятся центральные звенья регуляции уровня АД, а также надпочечник и почка, являющиеся эффекторными звеньями и мишенями при развитии АГ. Работа выявила большое число дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) во всех изучаемых органах/тканях крыс НИСАГ и WAG. В результате аннотации ДЭГ в базах данных RGD и DAVID были найдены многочисленные ДЭГ, ассоциированные с гипертонией и регуляцией уровня АД (Таблица 8), что подтвердило полигенную природу развития АГ у крыс НИСАГ.

Многие ДЭГ, ассоциированные с гипертонией, известны также и как гены,

Таблица 8. Анализ транскриптомов органов/тканей крыс НИСАГ и WAG

Орган/ткань	Число генов с детектированной экспрессией	Число ДЭГ	ДЭГ, ассоциированные с гипертонией и с регуляцией уровня АД
Ствол мозга	13546	224	22
Гипоталамус	11369	139	18
Надпочечник	12367	1113	76
Корковое в-во почек	13052	713	44
Мозговое в-во почек	13646	960	62

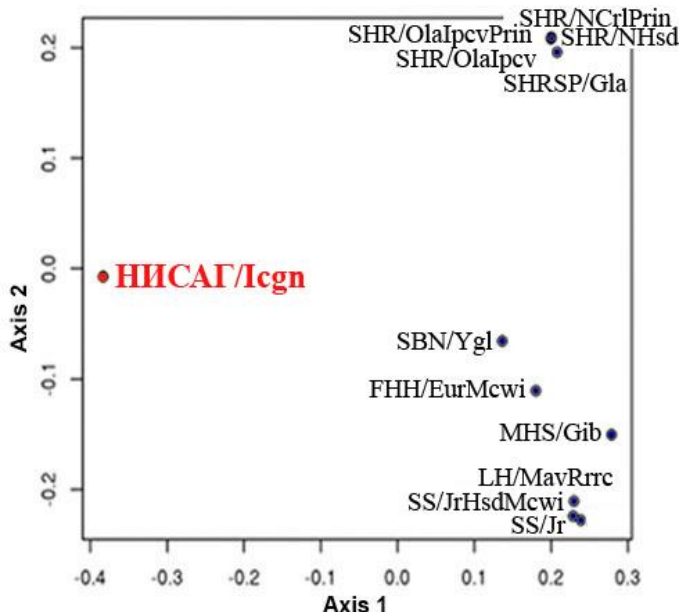
ассоциированные с заболеваниями, сопровождающими развитие АГ. Среди ДЭГ, ассоциированных с гипертонией, было найдено: в стволе мозга - 19 ДЭГ, ассоциированных с заболеваниями центральной нервной системы (ЦНС) и 3 ДЭГ с ишемией мозга; в гипоталамусе - 12 ДЭГ, ассоциированных с заболеваниями ЦНС, 6 ДЭГ - с инсулинорезистентностью и 9 ДЭГ - с цереброваскулярными заболеваниями; в надпочечнике 23 ДЭГ, ассоциированных с инсулинорезистентностью; в корковом веществе почек – 6 ДЭГ, ассоциированных с почечной гипертонией, 14 ДЭГ - с инсулинорезистентностью, 15 ДЭГ - с диабетической нефропатией и 20 ДЭГ - с заболеваниями иммунной системы; в мозговом веществе почек - 7 ДЭГ, ассоциированных с почечной гипертонией, 21 ДЭГ - с диабетической нефропатией, 18 ДЭГ - с инсулинорезистентностью, 2 ДЭГ - с развитием нефросклероза и 29 ДЭГ - с заболеваниями иммунной системы.

Во всех проанализированных органах/тканях функциональная аннотация ДЭГ в Gene Ontology выявила многочисленные группы генов, описываемые терминами, ассоциированными с циркуляцией крови, с регуляцией уровня АД, с изменениями гормонального статуса животных, а также с ответом на различные стимулы и стрессовые воздействия. Поскольку в эксперименте животные не подвергались каким-либо стрессирующим воздействиям, мы предполагаем, что среди ДЭГ в этих группах, должны находиться гены, способные компенсировать негативное влияние генетически обусловленного повышения реактивности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпатoadреналовой систем у крыс НИСАГ. Функциональная аннотация ДЭГ указала и на высокую значимость иммунных процессов при формировании межлинейных различий у крыс НИСАГ и WAG. С помощью базы данных KEGG были определены метаболические пути, к которым относятся ДЭГ. Результаты подтвердили участие гормональных процессов, изменения в контроле клеточной адгезии, важную роль воспалительных и иммунных процессов, а также ряда других метаболических путей при развитии АГ у крыс НИСАГ (см. текст диссертации).

Обсуждение результатов позволило предположить, что многие ДЭГ могут быть ответственными за развитие гипертензивного статуса и патологических

процессов у крыс НИСАГ, в то время как изменения в уровне транскрипции других ДЭГ могут оказывать компенсаторное действие и быть направлены на восстановление гомеостаза.

Определение генов-кандидатов на основании имеющихся в последовательности их мРНК нуклеотидных замен (SNPs). Относительно референсного генома крыс BN/NHsdMcwi было найдено 13255 SNPs в гомозиготном состоянии, которые имелись в транскриптом крыс НИСАГ, но не встречались у WAG. Сравнение списка этих SNPs с данными секвенирования геномов других 42-х линий и сублиний крыс показало, что 9814 из них встречаются и у нормотензивных линий крыс, 1434 SNPs встречаются у линий крыс, являющихся моделями других заболеваний (не гипертонии), 158 SNPs встречаются только у гипертензивных линий, а 1849 SNPs являются специфическими для крыс НИСАГ (см. Дополнительные файлы_1 и 2, <http://icg.nsc.ru/isiah/snp-2/>). Среди SNPs, специфических для крыс НИСАГ, оказались и 2 SNPs, приводящих к несинонимичным заменам аминокислот, способных изменять структуру и/или функцию белков, кодируемых генами *Eln* (p.Gly840Ser) и *Nisch* (p.Ser547Pro), которые ассоциированы с АГ.



Оценка методом многомерного шкалирования расстояний между генотипами крыс НИСАГ и других 11 гипертензивных линий и сублиний показала наличие значительных отличий генотипа крыс НИСАГ от генотипов всех остальных взятых в анализ гипертензивных линий крыс в рамках секвенированных транскрибируемых локусов (Рисунок 3).

Рисунок 3. Анализ генетического сходства гипертензивных линий крыс по SNPs

Максимальная частота встречаемости SNPs, детектированных только у гипертензивных линий/сублиний крыс, составила 0.58 (т.е. у 7 из 12) (Рисунок 4). Отсутствие SNPs, общих для всех гипертензивных линий крыс, указывает на высокую специфичность молекулярно-генетических механизмов развития разных форм АГ и позволяет предположить, что АГ является полиморфным заболеванием, скорее всего не имеющим единой этиологической базы, что определяет необходимость персонализированного подхода к ее лечению.



Рисунок 4. Анализ встречаемости SNPs, детектированных только у крыс гипертензивных линий/сублиний. Сублинии показаны одним цветом.

Определение генов-кандидатов на основании оценки их вклада в межлинейные различия. С помощью PLS-DA анализа, который используется для определения биомаркеров в исследованиях метаболомов и профилей экспрессии генов (Szymanska *et al.*, 2012) для каждого из органов/тканей были построены PLS-DA оси, максимизирующие расстояние между крысами НИСАГ и WAG в многомерном пространстве (Рисунок 5А). Далее была найдена корреляция между уровнем экспрессии генов и координатами крыс вдоль первой PLS-DA оси и построены гистограммы распределения генов в зависимости от расчетных коэффициентов корреляции (Рисунок 5Б). Гены, находящиеся на гистограммах в максимально полярном положении, предположительно делают максимальный вклад в межлинейные различия. ДЭГ, ассоциированные с АГ, которые могут делать максимальный вклад в межлинейные различия представлены в Таблице 9.

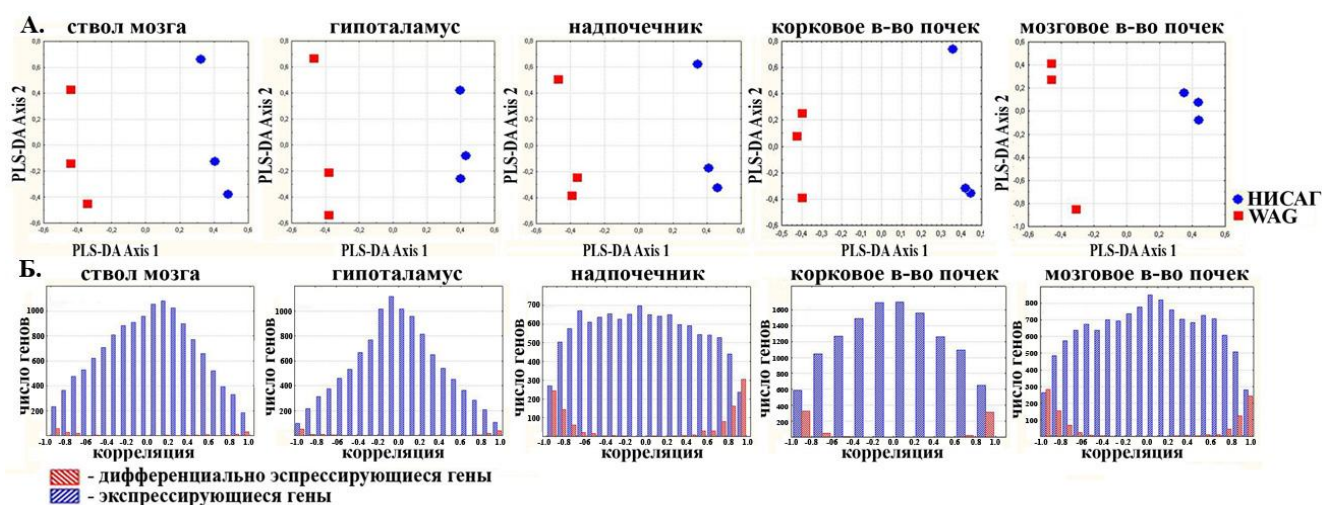


Рисунок 5. А. PLS-DA оси, максимизирующие расстояние между крысами НИСАГ и WAG в многомерном пространстве; Б. Гистограммы распределения генов, экспрессирующихся в органах/тканях крыс НИСАГ и WAG в зависимости от расчетных коэффициентов корреляции. Положение ДЭГ показано красным цветом.

Таблица 9. ДЭГ, ассоциированные с гипертонией, которые могут делать максимальный вклад в межлинейные различия

СИМВОЛ гена	r #	log2 (fold_change) НИСАГ/WAG	Название
СТВОЛ МОЗГА			
<i>Chi3l1</i>	-0.983	-1.36	chitinase 3-like 1
<i>F2r</i>	0.973	0.81	coagulation factor II receptor
<i>Ephx2</i>	0.982	4.23	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
<i>Tlr3</i>	0.989	0.96	toll-like receptor 3
ГИПОТАЛАМУС			
<i>Ephx2</i>	0.993	4.40	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
<i>Cst3</i>	-0.976	-0.59	cystatin C
<i>Ltbp2</i>	-0.989	-2.88	latent transforming growth factor beta binding protein 2
НАДПОЧЕЧНИК			
<i>Agt</i>	0.963	2.28	angiotensinogen
<i>Avpr1a</i>	0.969	1.12	arginine vasopressin receptor 1A
<i>Ephx2</i>	0.994	4.37	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
<i>Gabbr1</i>	0.993	1.11	gamma-aminobutyric acid B receptor 1
<i>Hsd11b2</i>	-0.971	-1.47	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2
<i>Igf1</i>	-0.956	-2.12	insulin-like growth factor 1
<i>Mpo</i>	0.984	4.46	myeloperoxidase
<i>S100b</i>	-0.971	-1.72	S100 calcium binding protein B
<i>Serpine1</i>	-0.956	-2.04	serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1
<i>Serpine2</i>	0.978	2.19	serpin peptidase inhibitor, clade E, member 2
КОРКОВОЕ В-ВО ПОЧЕК			
<i>Ace</i>	-0.919	-1.18	angiotensin I converting enzyme
<i>Acsm3</i>	0.999	2.51	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3
<i>Adra1b</i>	-0.894	-1.24	adrenoceptor alpha 1B
<i>Adra2a</i>	-0.910	-1.01	adrenoceptor alpha 2A
<i>ApoB</i>	-0.987	-2.52	apolipoprotein B
<i>Clu</i>	-0.989	-1.75	clusterin
<i>Ephx2</i>	0.998	4.48	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
<i>Glp1r</i>	0.997	3.79	glucagon-like peptide 1 receptor
<i>Hpgd</i>	0.994	4.30	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15
<i>Klk1c12</i>	-0.905	-1.86	kallikrein 1-related peptidase C12
<i>Klkb1</i>	0.968	2.22	kallikrein B, plasma 1
<i>Mmp9</i>	-0.986	-2.49	matrix metalloproteinase 9
<i>Sncg</i>	-0.913	-1.25	synuclein, gamma
<i>Tf</i>	-0.977	-1.50	transferrin
<i>Tgfb2</i>	0.979	1.07	transforming growth factor, beta 2
МОЗГОВОЕ В-ВО ПОЧЕК			
<i>Acsm3</i>	0.996	3.40	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3
<i>Adra1b</i>	-0.995	-1.31	adrenergic, alpha-1B- receptor
<i>Adra2a</i>	-0.960	-1.15	adrenergic, alpha-2A- receptor

Таблица 9 (продолжение)

СИМВОЛ гена	r [#]	log2 (fold_change) НИСАГ/WAG	Название
<i>Agtr1a</i>	-0.893	-0.47	angiotensin II receptor, type 1a
<i>Corin</i>	-0.960	-1.04	corin, serine peptidase
<i>Dio2</i>	-0.967	-2.56	deiodinase, iodothyronine, type II
<i>Ebag9</i>	0.928	0.49	estrogen receptor binding site associated, antigen, 9
<i>Ephx2</i>	0.994	4.52	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
<i>Pecam1</i>	-0.986	-0.45	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
<i>Tacr3</i>	-0.935	-1.22	tachykinin receptor 3
<i>Tf</i>	-0.939	-1.43	transferrin

[#] - коэффициент корреляции между уровнем транскрипции гена и координатами животных вдоль PLS-DA Axis 1;

Определение генов-кандидатов на основании их дифференциальной транскрипции во всех изученных органах/тканях. Было найдено 13 общих ДЭГ (Рисунок 6). Все 13 генов характеризуются единообразным изменением уровня транскрипции во всех проанализированных органах/тканях (Таблица 10).



Только один из них (*Ephx2*) является ассоциированным с гипертонией. В нашей работе во всех пяти органах/тканях уровень транскрипции гена *Ephx2* был достоверно повышен у крыс НИСАГ по сравнению с WAG, что было подтверждено методом ПЦР с детекцией в реальном времени (Рисунок 7).

Рисунок 6. Результат сравнения списков ДЭГ ствола мозга, гипоталамуса, надпочечника и почек крыс НИСАГ и WAG. Цифры – число ДЭГ.

Выше мы показали, что ген *Ephx2* является геном, дающим максимальный вклад в межлинейные различия во всех пяти органах/тканях, что позволяет рассматривать его как один из наиболее перспективных генов-кандидатов, вовлеченных в развитие АГ у крыс НИСАГ.

Ephx2 кодирует белок sEH (растворимую эпоксидгидролазу). Известно, что sEH катаболизирует эпоксиэйкозатриеновые кислоты (EETs), которые, синтезируясь в сосудистой эндотелии (Yu *et al.*, 2004), способствуют релаксации сосудов (Campbell & Fleming, 2010), участвуют в процессе нейрогенного контроля мозгового кровотока (Piff *et al.*, 2007), оказывают противовоспалительное действие, что защищает сосуды от повреждений при развитии почечных и сердечно-сосудистых заболеваний (Imig, 2005).

Таблица 10. ДЭГ, общие для всех проанализированных органов/тканей крыс НИСАГ и WAG в возрасте 3-х месяцев

СИМВОЛ гена	log2(fold_change) НИСАГ/WAG				
	СТВОЛ МОЗГА	ГИПОТАЛАМУС	НАДПОЧЕЧНИК	КОРКОВОЕ В-ВО ПОЧКИ	МОЗГОВОЕ В-ВО ПОЧКИ
<i>Ephx2*</i>	4.23	4.39	4.37	4.48	4.52
<i>Fhit</i>	2.12	1.16	3.83	0.80	1.58
<i>Gstm4</i>	-1.95	-1.77	-1.22	-0.86	-1.13
<i>Hbb-b1</i>	1.42	1.55	1.32	1.62	1.18
<i>Ifi27</i>	0.86	1.03	1.91	1.25	0.50
<i>LOC100134871</i>	3.65	3.53	3.78	3.33	2.72
<i>LOC689064</i>	1.88	3.22	2.02	2.33	2.38
<i>Pyroxd2</i>	-2.50	-2.88	-3.98	-1.13	-1.00
<i>Retsat</i>	1.86	1.81	2.59	1.85	2.05
<i>RT1-A1</i>	1.07	0.95	1.44	1.84	1.19
<i>RT1-A2</i>	-1.94	-1.85	-1.82	-1.63	-2.08
<i>RT1-S3</i>	-2.02	-2.04	-0.55	-0.49	-0.96
<i>Rufy1</i>	-0.62	-0.62	-1.49	-0.66	-0.73

*- гены, ассоциированные с АГ (согласно аннотации в RGD)

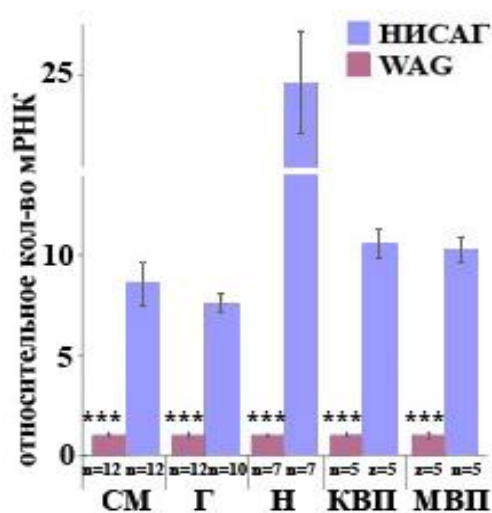


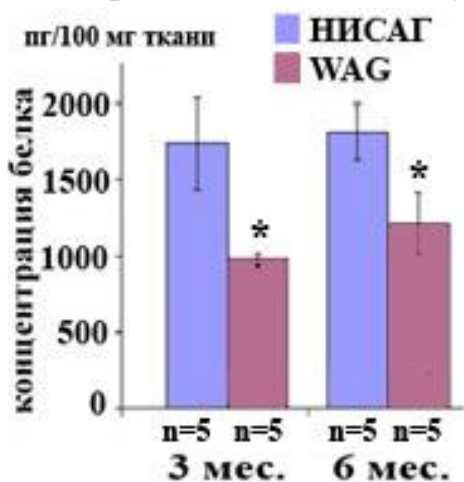
Рисунок 7. Межлинейные различия в уровне транскрипции гена *Ephx2*. СМ – ствол мозга, Г – гипоталамус, Н – надпочечник, КВП и МВП – корковое и мозговое в-во почек. *** - $p < 0.001$.

Метаболизируя EETs с образованием неактивных производных, sEH ограничивает тем самым проявление их функциональной активности. Ассоциация sEH с развитием АГ была показана у крыс SHR (Sellers *et al.*, 2005), при индукции АГ ангиотензином II (Imig *et al.*, 2002) и при программируемой АГ (Tain *et al.*, 2015). Показано, что ингибиторы sEH понижают уровень АД, как у мышей, так и у крыс с индуцированной АГ (Jung *et al.*, 2005; Loch *et al.*, 2007), при этом почки, сердце и сосуды сохраняются от повреждающего воздействия высокого АД (Honetschlagerova *et al.*, 2011; Qiu *et al.*, 2011). У мышей, нокаутных по гену *Ephx2*, наблюдали пониженный уровень АД, а также снижение проявления воспалительных реакций, отсутствие аритмии и сердечной недостаточности, уменьшение степени повреждений в почках (Manhiani *et al.*, 2009). Снижение уровня sEH оказывает защитное действие при развитии ишемии мозга (Simpkins *et al.*, 2009). Многие исследователи склонны считать, что sEH может быть перспективной мишенью для фармацевтического воздействия, направленного на лечение АГ (Chiamvimonvat *et al.*, 2007; Fang, 2006), сердечно-сосудистых

заболеваний (Ni *et al.*, 2011), ишемии мозга (Zhang *et al.*, 2008), а также мозгового инсульта (Zhang *et al.*, 2007).

Известно, что снижение кровотока в мозговом веществе почек является достаточным событием для формирования почечной дисфункции и развития АГ (Cowley *et al.*, 1995). Одной из причин возникновения дисфункции и снижения кровотока в мозговом веществе почки считается наличие окислительного стресса, развитие которого связывают с образованием активных форм кислорода, а процесс восстановления гомеостаза связывают с синтезом оксида азота (NO) (Cowley *et al.*, 2015). Существует мнение, что EETs могут активировать эндотелиальную NO-синтазу (eNOS), в результате чего и запускается процесс релаксации сосудов (Hercule *et al.*, 2009).

Полученные нами результаты хорошо согласуются с этими представлениями о механизмах развития АГ - в мозговом веществе почек крыс НИСАГ по сравнению с WAG нами был показан повышенный уровень транскрипции гена *Ephx2* и повышенная концентрация кодируемого им белка sEH (Рисунок 8), а также был детектирован сниженный уровень транскрипции гена *Nos3*, кодирующего



эндотелиальную NO-синтазу (см. текст диссертации). Эти результаты позволяют предполагать наличие окислительного стресса, снижение синтеза NO и пониженного уровня кровотока в мозговом веществе почек гипертензивных крыс НИСАГ. Возможно, эти события являются критическими при развитии АГ у крыс НИСАГ.

Рисунок 8. Концентрация белка sEH в мозговом веществе почек крыс НИСАГ и WAG. *-p<0.05.

Среди перечисленных в Таблице 10 ДЭГ и другие гены могут быть потенциально интересными, так как список генов, ассоциированных с АГ, постоянно расширяется, а ряд генов из Таблицы 10, пока мало изучены.

Определение позиционных генов-кандидатов на основании их положения в QTLs. Результаты выполненной работы позволили собрать данные для эффективного поиска генов-кандидатов в локусах, ассоциированных с уровнем АД в покое и при стрессе, а также с признаками, сопровождающими развитие гипертензивного статуса крыс НИСАГ. Нижеописанные результаты являются примером использования этих данных.

Позиционные гены-кандидаты в QTL, ассоциированном с уровнем АД в покое на хромосоме 11. Этот локус полностью совпал с QTL для признака

относительный вес почек, который в данном локусе может выполнять роль вспомогательного фенотипа для поиска генов-кандидатов, регулирующих уровень АД в покое у крыс НИСАГ. Анализ транскриптомов крыс НИСАГ и WAG выявил 6 ДЭГ в корковом веществе почек и 3 ДЭГ в мозговом веществе почек (Таблица 11), локализованных в данном локусе (Рисунок 9А). Анализ информации, имеющейся в базах данных, а также данных литературы, позволил рассматривать ген *Rcan1* как наиболее вероятный ген-кандидат в QTL на хромосоме 11.

Таблица 11. ДЭГ в почках крыс НИСАГ и WAG, локализованные на хромосоме 11 в QTL, ассоциированном с относительным весом почек и уровнем АД в покое

Символ гена	Mb	log2 (fold change) НИСАГ/WAG	q_value	Название
Корковое вещество почек				
<i>Kcne1</i>	36.10	2.89	0.0018	potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 1
<i>Rcan1</i>	36.15	-0.88	0.0018	regulator of calcineurin 1
<i>Mx1</i>	41.40	1.32	0.0018	myxovirus resistance 1
<i>Mx2</i>	41.55	3.40	0.0018	myxovirus resistance 2
<i>Tmprss2</i>	41.57	0.91	0.0018	transmembrane protease, serine 2
<i>RGD1559516</i>	43.72	1.23	0.0059	similar to ribosomal protein S2
Мозговое вещество почек				
<i>Rcan1</i>	36.15	-0.58	0.0094	regulator of calcineurin 1
<i>Mx2</i>	41.55	1.33	0.0016	myxovirus resistance 2
<i>Tmprss2</i>	41.57	0.45	0.0383	transmembrane protease, serine 2

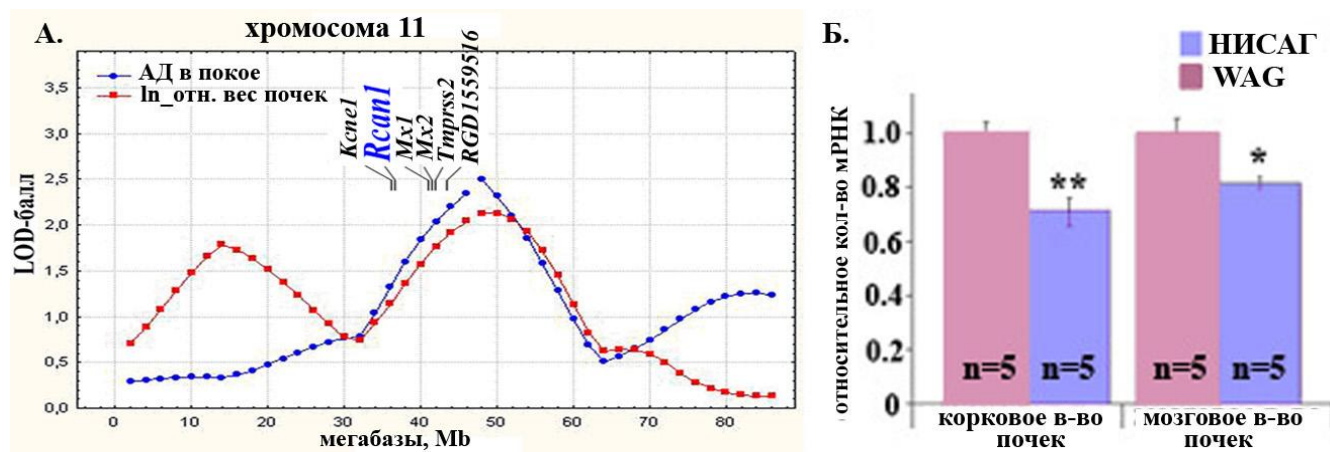


Рисунок 9. А) ДЭГ в почках крыс НИСАГ и WAG в QTL на хромосоме 11, ассоциированном с признаками уровень АД в покое и относительный вес почек.

Б) Сравнение уровня транскрипции гена *Rcan1* в корковом и мозговом веществе почек крыс НИСАГ и WAG методом ПЦР с детекцией в реальном времени.

*- $p=0.016$; **- $p=0.008$ (U-тест Манна-Уитни);

Rcan1 (regulator of calcineurin 1) известен как негативный регулятор кальцинейрина, являющегося кальций-зависимой фосфатазой. Кальцинейрин вовлечен в процесс развития гипертрофии гломерул и синтез экстраклеточного

матрикса, что было показано на крысах с индуцированной диабетической нефропатией (Gooch *et al.*, 2003). Известно, что ингибиторы кальцинейрина усиливают симпатическую нейротрансмиссию в почках, и при этом наблюдается повышение уровня АД (Zhang & Victor, 2000). Соответственно, ослабление ингибирующего влияния *Rcan1*, которое можно предполагать в нашем эксперименте, должно поддерживать повышенный уровень активности кальцинейрина и оказывать обратный эффект, т.е. приводить к гипертрофии почек, но снижать уровень симпатической активации и уровень АД. Снижение уровня транскрипции гена *Rcan1* в почках крыс НИСАГ (подтверждено методом qPCR, Рисунок 9Б), вероятно, является важным адаптивным событием, так как направлено на снижение симпатической стимуляции почки при имеющейся у крыс НИСАГ наследственно обусловленной повышенной активности симпатической нервной системы. Перечисленные выше функции белка, кодируемого геном *Rcan1*, позволяют сделать вывод о том, что этот ген является перспективным позиционным геном-кандидатом в QTL на хромосоме 11.

Позиционные гены-кандидаты в QTL на хромосоме X, ассоциированном с повышением уровня АД при стрессе, с концентрацией кортикостерона в плазме крови при стрессе и с весом надпочечников. В этом локусе было найдено 9 генов, дифференциально экспрессирующихся в надпочечниках крыс НИСАГ и WAG (Таблица 12). Их локализация в QTL показана на Рисунке 10А.

Анализ известных функций найденных ДЭГ позволил определить ген *Sms*, кодирующий спермин синтазу, как позиционный ген-кандидат в QTL на хромосоме X. Снижение уровня его транскрипции в надпочечниках крыс НИСАГ было подтверждено методом ПЦР в реальном времени (Рисунок 10Б).

Таблица 12. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в надпочечниках крыс НИСАГ и WAG в возрасте 3-х месяцев и локализованные в QTL на хромосоме X

Символ гена	Мега-базы	log2 (fold_change) НИСАГ/WAG	q_value	Название гена
<i>Sms</i> [#]	40.7	-0.54	0.027	spermine synthase
<i>Pnpla4</i> [#]	45.7	0.84	0.042	patatin-like phospholipase domain-containing protein 4-like
<i>Prrg1</i>	45.9	-0.72	0.018	proline rich and Gla domain 1
<i>Gk</i>	54.4	-0.63	0.043	glycerol kinase
<i>Nexmif</i> [#]	75.7	-0.46	0.048	neurite extension and migration factor
<i>Tspan6</i>	104.6	-0.67	0.002	tetraspanin 6
<i>Tmem35a</i>	105.0	0.75	0.052	transmembrane protein 35a
<i>Armcx3</i>	105.4	-0.53	0.018	armadillo repeat containing, X-linked 3
<i>Tmem164</i>	112.4	-0.48	0.038	transmembrane protein 164

[#] - гены, ассоциированные с заболеваниями нервной системы;

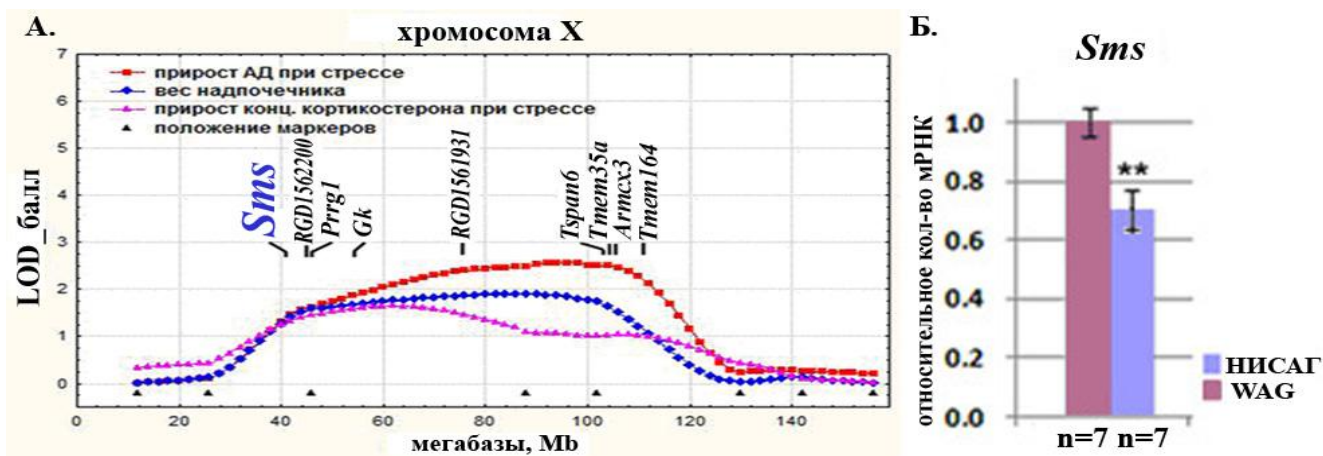


Рисунок 10. А. Локализация ДЭГ в QTL на хромосоме X; Б. Сравнение уровня транскрипции гена *Sms* в надпочечниках крыс НИСАГ и WAG методом ПЦР в реальном времени. ** - $p < 0.01$.

Спермин относится к полиаминам. Он предотвращает образование супероксида, оказывая антиоксидативное и противовоспалительное действие (Løvaas, 1995). Показано, что спермин может противодействовать эффектам синтетического глюкокортикоида дексаметазона в гепатоцитах (Pittner *et al.*, 1986) и ингибировать индуцированный дексаметазоном апоптоз тимоцитов (Hegardt *et al.*, 2001). Считается, что полиамины могут опосредовать ответ на стресс через позитивную регуляцию экспрессии генов, участвующих в ответе на стрессовые факторы, что может объяснять их протективное действие против различных видов стресса (Rhee *et al.*, 2007). Спермин играет важную роль в регуляции ионных каналов, включая каналы, регулирующие мембранный потенциал и гомеостаз ионов калия в клетках всего организма, а также каналы, которые влияют на внутриклеточные сигнальные пути кальция и транспорт ионов натрия (Fleiderovich *et al.*, 2008; Kurata *et al.*, 2008; Pegg, 2009).

Снижение уровня транскрипции гена *Sms* может приводить к снижению количества спермин синтазы и, возможно, количества спермина, что может снижать противодействие организма эффектам глюкокортикоидов, приводить к повышению уровня оксидативного стресса, а также к нарушению регуляции работы ионных каналов. Все эти эффекты способны провоцировать повышение уровня АД и развитие АГ. Таким образом, снижение уровня транскрипции гена *Sms* в надпочечниках крыс НИСАГ, вероятно, может увеличивать стресс-чувствительность организма и ген *Sms* можно считать позиционным геном-кандидатом в QTL на хромосоме X.

ВЫВОДЫ

1. Генетическое картирование (QTL анализ) позволило в масштабе всего генома выявить генетические локусы, ассоциированные с уровнем АД в покое и при стрессе, а также с признаками, сопровождающими развитие гипертензивного

статуса крыс НИСАГ - вес тела, абсолютный и относительный вес органов-мишеней (надпочечники, почки, сердце, селезенка), концентрация кортикостерона в плазме крови в покое и при стрессе.

2. Гипертензивный статус крыс НИСАГ в возрасте 3-4-х месяцев характеризуется наличием генетических локусов, для которых были найдены статистически вероятные ассоциации с признаками АД и статистически высокодостоверные ассоциации с признаками, сопровождающими развитие гипертензивного статуса крыс НИСАГ (вес тела, относительный вес почек, концентрация кортикостерона в плазме крови при стрессе).

3. Высокая стресс-чувствительность крыс линии НИСАГ в возрасте 3-4-х месяцев, характеризующаяся резким повышением уровня АД в ответ на воздействие рестрикционного стресса, ассоциирована с генетическими локусами на хромосомах 11, 15 и X.

4. Гипертензивный статус крыс НИСАГ в возрасте 6-и месяцев характеризуется наличием генетических локусов, для которых были найдены статистически высокодостоверные ассоциации с уровнем АД в покое и при стрессе в дистальной части хромосомы 1, а также высокодостоверные ассоциации с признаками, сопровождающими развитие гипертензивного статуса крыс НИСАГ (вес тела, абсолютный и относительный вес надпочечников, относительный вес селезенки, концентрация кортикостерона в плазме крови при стрессе).

5. Взаимное расположение найденных локусов на генетической карте продемонстрировало сложную архитектуру генетического контроля изучаемых фенотипических признаков в обеих возрастных группах крыс.

6. Наличие общих локусов, ассоциированных как с признаками АД (АД в покое, АД при стрессе и прирост АД при стрессе), так и с весовыми характеристиками органов-мишеней (почки, сердце и надпочечники), свидетельствует о существовании генов, оказывающих плеiotропное влияние на эти признаки, либо тесно сцепленных генов, контролирующих АД и признаки, сопровождающие гипертонию и связанные с изменениями весовых параметров органов-мишеней у крыс НИСАГ.

7. Генетический контроль уровня АД и связанных с ним признаков у крыс НИСАГ изменяется в процессе взросления животных.

8. В проанализированных органах/тканях - в двух структурах мозга (ствол мозга и гипоталамус), и в периферических органах-мишенях (надпочечник, почки) гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс WAG имеются многочисленные дифференциально экспрессирующиеся гены, ассоциированные с развитием артериальной гипертонии и с другими патофизиологическими изменениями, сопровождающими развитие заболевания.

9. Согласно функциональной аннотации дифференциально экспрессирующихся генов, проявление гипертензивного фенотипа крыс НИСАГ сопровождается изменениями гормонального статуса животных, изменением регуляции метаболических процессов и процессов, связанных с ответом на различные стимулы и стресс, в том числе с компенсаторными реакциями, направленными на поддержание гомеостаза, а также с иммунными и воспалительными процессами.

10. Ген *Ephx2*, является одним из наиболее перспективных для дальнейшего изучения возможности его использования в качестве мишени для фармакологического воздействия, направленного на профилактику или коррекцию гипертензивного состояния при развитии стресс-чувствительной формы гипертонии.

11. Генотип крыс НИСАГ значительно отличается от генотипов крыс других гипертензивных линий. Разные формы артериальной гипертонии, воспроизводимые на всех известных генетических моделях крыс, характеризуются наличием специфических молекулярно-генетических механизмов развития их гипертензивного статуса, что характеризует артериальную гипертонию как генетически гетерогенное заболевание, не имеющее единой этиологии, и диктует необходимость разработки персонализированного подхода к диагностике, лечению и профилактике гипертонической болезни в клинике.

12. Результаты проведенной работы (геномного картирования, анализа генотипа и уровня экспрессии генов в стволе мозга, гипоталамусе, надпочечниках и почках крыс НИСАГ, известных как основные органы-мишени при развитии гипертонии) являются полезным дополнением к результатам аналогичных работ, выполняемых в зарубежных лабораториях на линиях крыс и мышей, моделирующих другие формы АГ, и могут быть использованы для определения как общих, так и специфических молекулярных детерминант при изучении разных моделей АГ с целью определения потенциальных мишеней для терапии или профилактики гипертонии, а также сопутствующих патологий.

Список статей, опубликованных по теме диссертации

1. **Редина О.Е.**, Девяткин В.А., Ершов Н.И., Маркель А.Л. Генетический полиморфизм экспериментально воспроизводимых форм артериальной гипертонии // Генетика. - 2020. - Т. 56. – № 2. – С. 211-224.
2. Fedoseeva L.A., Klimov L.O., Ershov N.I., Efimov V.M., Markel A.L., Orlov Yu.L., **Redina O.E.** The differences in brain stem transcriptional profiling in hypertensive ISIAH and normotensive WAG rats // BMC Genomics. - 2019. – V. 20. – Suppl. 3. - 297.
3. **Redina O.E.**, Markel A.L. Stress, genes, and hypertension. Contribution of the ISIAH rat strain study // Current Hypertension Reports. - 2018. – V. 20. - № 8. - 66.

4. Маркель А.Л., **Редина О.Е.** Эпигенетические механизмы регуляции артериального давления и гипертоническая болезнь // Молекулярная биология. – 2018. – Т. 52. – № 2. – С. 172-189.
5. **Редина О.Е.**, Абрамова Т.О., Климов Л.О., Рязанова М.А., Федосеева Л.А., Смоленская С.Э., Ершов Н.И., Дубинина А.Д., Маркель А.Л. Растворимая эпоксидгидролаза (sEH) как потенциальная мишень для лекарственной терапии артериальной гипертензии // Генетика. - 2017. – Т. 53. - № 9. – С. 1025-1034.
6. Ершов Н.И., Маркель А.Л., **Редина О.Е.** Однонуклеотидные полиморфизмы, специфичные для гипертензивных крыс линии НИСАГ // Биохимия. - 2017. - Т. 82. - № 2. – С. 345-357.
7. Абрамова Т.О., Рязанова М.А., Антонов Е.В., **Редина О.Е.**, Маркель А.Л. Повышение концентрации белка sEH в мозговом веществе почек крыс НИСАГ с наследуемой, индуцируемой стрессом, артериальной гипертензией // Молекулярная биология. - 2017. – Т. 51. - № 3. – С. 442–446.
8. Fedoseeva L.A., Klimov L.O., Ershov N.I., Alexandrovich Yu.V., Efimov V.M., Markel A.L., **Redina O.E.** Molecular determinants of the adrenal gland functioning related to stress-sensitive hypertension in ISIAH rats // BMC Genomics. – 2016. – V. 17. – Suppl. 14. – 989.
9. Ryazanova M.A., Fedoseeva L.A., Ershov N.I., Efimov V.M., Markel A.L., **Redina O.E.** The gene-expression profile of renal medulla in ISIAH rats with inherited stress-induced arterial hypertension // BMC Genetics. - 2016. - V. 17. – Suppl. 3. - 151.
10. **Редина О.Е.**, Смоленская С.Э., Федосеева Л.А., Маркель А.Л. Дифференциально экспрессирующиеся гены в локусе, ассоциированном с относительным весом почек и уровнем артериального давления в покое у гипертензивных крыс линии НИСАГ (ISIAH) // Молекулярная биология. - 2016. - Т. 50. - № 6. – С. 944–952.
11. Klimov L.O., Ershov N.I., Efimov V.M., Markel A.L., **Redina O.E.** Genome-wide transcriptome analysis of hypothalamus in rats with inherited stress-induced arterial hypertension // BMC Genetics. – 2016. – V. 17. – Suppl. 1. - 13.
12. Antonov Ye.V., Alexandrovich Yu.V., **Redina O.E.**, Gilinsky M.A., Markel A.L. Stress and hypertensive disease: adrenals as a link. Experimental study on hypertensive ISIAH rat strain // Clinical and Experimental Hypertension. - 2016. – V. 38. - № 5. – P. 415-423.
13. Fedoseeva L.A., Ryazanova M.A., Ershov N.I., Markel A.L., **Redina O.E.** Comparative transcriptional profiling of renal cortex in rats with Inherited Stress-Induced Arterial Hypertension and normotensive Wistar Albino Glaxo rats // BMC Genetics. – 2016. – V. 17. – Suppl. 1. - 12.
14. Абрамова Т.О., Смоленская С.Э., Антонов Е.В., **Редина О.Е.**, Маркель А.Л. Экспрессия генов катехол-о-метилтрансферазы (*Comt*), минералокортикоидного рецептора (*Mlr*) и эпителиального натриевого канала (*ENaC*) в почках гипертензивных крыс линии НИСАГ (ISIAH) в покое и при ответе на стресс // Генетика. - 2016. – Т. 52. - № 2. - С. 206–214.
15. **Redina O.E.**, Smolenskaya S.E., Klimov L.O., Markel A.L. Candidate genes in quantitative trait loci associated with absolute and relative kidney weight in rats with Inherited Stress Induced Arterial Hypertension // BMC Genetics. – 2015. – V. 16. – Suppl. 1. - S1.
16. **Redina O.E.**, Smolenskaya S.E., Abramova T.O., Ivanova L.N., Markel A.L. Differential transcriptional activity of kidney genes in hypertensive ISIAH and normotensive WAG rats // Clinical and Experimental Hypertension. – 2015. – V. 37. - № 3. – P. 249-259.
17. **Редина О.Е.**, Климов Л.О., Ершов Н.И., Абрамова Т.О., Иванова Л.Н., Маркель А.Л. Сниженный уровень экспрессии генов, контролирующих тонус сосудов в почках

крыс НИСАГ со стресс-зависимой артериальной гипертензией // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2014. - Т. 18. - №. 4/2. - С. 910-919.

18. **Редина О.Е.**, Смоленская С.Э., Абрамова Т.О., Маркель А.Л. Генетические локусы, контролирующие вес селезенки и уровень артериального давления у крыс НИСАГ со стресс зависимой артериальной гипертензией//Молекулярная биология. - 2014. – Т. 48. - №3. - С. 407–415.

19. Абрамова Т.О., **Редина О.Е.**, Смоленская С.Э., Маркель А.Л. Повышенный уровень экспрессии мРНК гена *Ephx2* в почках гипертензивных крыс линии НИСАГ (ISIAH) // Молекулярная биология. - 2013. – Т. 47. - № 6. - С. 942-948.

20. **Redina O.E.**, Smolenskaya S.E., Maslova L.N., Markel A.L. The genetic control of blood pressure and body composition in rats with stress-sensitive hypertension // Clinical and Experimental Hypertension. - 2013. - V. 35. - № 7. - P. 484-495.

21. Пыльник Т.О., **Редина О.Е.**, Смоленская С.Э., Маркель А.Л., Иванова Л.Н. Особенности экспрессии генов *Egf* и *Egfr* в ткани почки гипертензивных крыс линии НИСАГ (ISIAH) // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2012. - Т. 98. - № 3. - С. 69-76.

22. Пыльник Т.О., Плетнева Л.С., **Редина О.Е.**, Смоленская С.Э., Маркель А.Л., Иванова Л.Н. Влияние эмоционального стресса на экспрессию мРНК гена *α-ENaC* в почке гипертензивных крыс линии НИСАГ // Доклады Академии Наук. - 2011. – Т. 439. - № 4. - С. 563–565.

23. **Redina O.E.**, Smolenskaya S.E., Maslova L.N., Markel A.L. Genetic control of the corticosterone level at rest and under emotional stress in ISIAH rats with Inherited Stress-Induced Arterial Hypertension // Clinical and Experimental hypertension.- 2010. – V. 32. № 6. – P. 364-371.

24. Markel A.L., **Redina O.E.**, Gilinsky M.A., Dymshits G.M., Kalashnikova E.V., Khvorostova Y.V., Fedoseeva L.A., Jacobson G.S. Neuroendocrine profiling in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension // Journal of Endocrinology – 2007. – V. 195. - № 3. – P. 439-450.

25. **Redina O.E.**, Machanova N.A., Efimov V.M., Markel A.L. Rats with Inherited Stress-Induced Arterial Hypertension (ISIAH strain) display specific quantitative trait loci for blood pressure and for body and kidney weight on chromosome 1 // Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. - 2006. - V. 33. - № 5-6. - P. 456-464.

26. Хворостова Ю.В., Калашникова Е.В., Черкасова О.П., Федосеева Л.А., **Редина О.Е.**, Дымшиц Г.М., Маркель А.Л. Особенности экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора у гипертензивных крыс линии НИСАГ // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2003. - Т. 89. - № 12. – С. 1523-1528.

27. **Редина О.Е.**, Хворостова Ю.В., Дымшиц Г.М., Маркель А.Л. Поиск генетических локусов, ответственных за повышение АД у крыс линии НИСАГ в условиях эмоционального стресса // Генетика. – 2003. - Т. 39. - № 6. - С. 813-818.

28. Хворостова Ю.В., Горякин С.В., Петрова Г.В., Филипенко М.Л., Шихевич С.Г., **Редина О.Е.**, Дымшиц Г.М., Маркель А.Л. Характеристика гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы у гипертензивных крыс линии НИСАГ // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2002. - Т. 88. - № 11. – С. 1423-1432.

29. **Редина О.Е.**, Лаптева Н.Э., Ханина С.Л., Маханова Н.А., Дымшиц Г.М., Маркель А.Л. Район 10-й хромосомы крысы (локус гена *Ngfr*) ассоциирован с повышением артериального давления при эмоциональном стрессе // Доклады Академии Наук.– 2001. - Т. 380. - № 4. - С. 556-558.

Подписано в печать _____._____._____

Формат 60x 90 1/16 печ. л. 2,0. Уч.-изд. л. 2,1.

Тираж 120 экз. Заказ № ____

Отпечатано на полиграфической базе ИЦиГ СО РАН
630090, Новосибирск, проспект акад. Лаврентьева, 10