ВОЗМОЖНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В РАЗВИТИИ СИНДРОМА ДЕФИЦИТА ВНИМАНИЯ С ГИПЕРАКТИВНОСТЬЮ У ДЕТЕЙ. РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКЕ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЭТОГО СИНДРОМА

© Альдекеева Анна Сергеевна, Клюева Наталья Зиновьевна

Институт физиологии имени И.П. Павлова. 199034, Санкт-Петербург, наб.Макарова, д.6. E-mail: kardio_lab@mail.ru

Ключевые слова: диагностика; белки; кальций.

Введение. Крысы со спонтанной гипертензией (линия SHR) являются ценной экспериментальной моделью для изучения синдрома дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ) у детей, на них можно изучать особенности различных проявлений синдрома, таких как гиперактивность, нарушение концентрации внимания и импульсивность. Показано, что крысы линии SHR демонстрируют более высокий уровень двигательной активности, а также отличаются по распределению активности в тёмное и светлое время суток от крыс линии WKY (их нормотензивный контроль). Однако, механизм возникновения таких отличий и возможные молекулярные и клеточные процессы, в нём участвующие, изучены недостаточно. Для крыс линии SHR характерны генетически детерминированные нарушения обмена кальция в клетке, приводящие к перегрузке цитозоля клеток несвязанными ионами Ca^{2+}. Также у этих животных имеются серьёзные отличия в обмене катехоламинов. Оба этих процесса активно участвуют в регуляции суточных ритмов на клеточном уровне, что позволяет предположить участие их в формировании гиперактивности. Другим следствием нарушения обмена кальция в клетке у крыс линии SHR являются изменения в уровне экспрессии мРНК белков — мажорных субстратов протеинкиназы С (ПКС), а именно NAP-22, который был обнаружен в нервной ткани, но встречается и в других органах. Исследуемый белок участвует в кальциевом пути передачи внутриклеточного сигнала, непосредственно взаимодействуя с протеинкиназой С и кальмодулином. Изменения обмена NAP-22 в отногенезе могут проявляться в нарушениях формирования нервных сетей и влиять на синаптическую пластичность. Поэтому белок NAP-22 — возможный кандидат на роль молекулярного маркера СДВГ. Это заболевание широко распространено во всём мире, но в настоящее время нет общепринятого эффективного способа диагностики и лечения этого синдрома. Поскольку СДВГ проявляется в раннем детском возрасте, мы исследовали особенности уровня экспрессии мРНК белка NAP-22 в теменной коре и гиппокампе экспериментальных животных в раннем постнатальном онтогенезе.

Цель исследования. Определить уровень экспрессии мРНК NAP-22 в теменной коре и гиппокампе у крыс линий SHR и WKY в раннем постнатальном онтогенезе для оценки возможности использования его в качестве молекулярного маркера риска развития СДВГ.

Материалы и методы. Исследование уровня экспрессии мРНК NAP-22 в раннем постнатальном онтогенезе проводилось на крысах линий SHR и WKY. Животные каждой линии были разделены на 2 группы. Первая группа на протяжении трёх поколений получала воду с нормализованным содержанием Ca^{2+}, соответствующим рекомендованным ВОЗ (80 мг/л). Вторая группа получала маломинерализованную воду с содержанием Ca^{2+} 8 мг/л. В третьем поколении в обеих группах отбирались по 5 животных в возрасте 5, 13, 18 и 30 дней для последующих исследований. Для получения образцов нервной ткани (теменная кора и гиппокамп) животные были декапитированы под легким эфирным наркозом. Из образцов нервной ткани крыс обеих линий была выделена валовая мРНК с помощью набора Quick-RNA™ MiniPrepKit (ZymoResearch, США) согласно протоколу исследования. Далее осуществляли синтез комплементарной ДНК обратной транскрипцией. Уровни экспрессии NAP-22 определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров на амплификаторе АНК-32 (ИАП РАН, Россия). В качестве референса для нормировки результатов

амплификации использовали ген β-актина. Разницу в экспрессии мРНК оценивали по методу Стьюдента.

Результаты. В теменной коре были обнаружены межлинейные различия в уровне экспрессии мРНК NAP-22 на 5 и 13 дни, при этом у крыс линии SHR уровень экспрессии мРНК NAP-22 оказался выше, чем у крыс линии WKY. Недостаточное поступление кальция вызывало сходные изменения у животных обеих линий. Так, на 5, 13 и 18 дни наблюдался рост уровня экспрессии мРНК NAP-22 у крыс линий SHR и WKY, по сравнению с животными, получавшими нормализованную по кальцию воду. Для крыс линии SHR, получавших нормализованную воду, уровень экспрессии мРНК NAP-22 снижался для характерного для нормотензивных крыс уже к 18 дню постнатального развития.

В гиппокампе у всех групп животных уровень экспрессии мРНК NAP-22 сохранялся на одном уровне, существенных различий в уровне экспрессии мРНК NAP-22 обнаружить не удалось, как при недостаточном поступлении кальция, так и при компенсации такого дефицита.

Изменения уровня экспрессии мРНК белка NAP-22, мажорного субстрата ПКС в нейронах теменной коры, могло бы косвенно отражать изменения функционирования соответствующего кальций-зависимого каскада передачи внутриклеточного сигнала в нейронах этих структур. Наши результаты подтверждают, что генетически детерминированные нарушения обмена кальция в клетках этих животных могут затрагивать не только структуры сердечно-сосудистой системы, но и структур ЦНС. Это доказывается изменениями обмена белка NAP-22 у крыс линии SHR при увеличенном поступлении кальции в организм. Особенности обмена белка NAP-22 у крыс со спонтанной гипертензией очень важны для оценки функций, которые этот белок может осуществлять в норме и в патологии. Белок NAP-22 в процессе онтогенеза активно участвуют в образовании нейронных сетей, а у взрослых животных в обеспечении процессов нейропластичности, и нарушения или изменения их обмена в нейронах может свидетельствовать о нарушениях этих процессов, что, в свою очередь может оказаться одним из механизмов реализации характерных для СДВГ поведенческих нарушений. NAP-22 не является исключительно нейроспецифичным белком, поэтому исследование его обмена обладает более высокой диагностической ценностью.

Заключение. Исследование белков — основных субстратов ПКС позволяют выявить связь наблюдаемых молекулярных закономерностей именно с генерализованной патологией, что и имеет место у крыс линии SHR — генетически детерминированные нарушения обмена кальция в клетках, общее повышение артериального давления, а также такие симптомы СДВГ, как гиперактивность, импульсивность, сложности с обучением. Полученные нами данные дополняют характеристику крыс линии SHR в качестве модели СДВГ по динамике распределения двигательной активности, а также в качестве животных с генетически детерминированными нарушениями метаболизма катехоламинов и кальция в клетках. Для решения вопроса о связи нарушений обмена белков — основных субстратов ПКС и развитием СДВГ требуется дальнейшее исследование.