
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *AQP4*
В ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС ПРИ СМЕНЕ ПИТЬЕВОГО РЕЖИМА
И АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ**

© 2024 г. А. А. Евтушенко^{1,*}, И. В. Орлов^{1,2}, И. П. Воронова¹, Т. В. Козырева^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Россия, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

*E-mail: evtushenkoaa@neuronm.ru

Поступила в редакцию 10.01.2024 г.

После доработки 30.01.2024 г.

Принята к публикации 31.01.2024 г.

Аквапорин-4 (AQP4) является основным водным каналом в центральной нервной системе. Его высокая экспрессия в структурах головного мозга предполагает важную роль в транспорте воды в норме и при патологии. Исследовалось влияние изменения питьевого режима (водная депривация и гипергидратация) и наследственной артериальной гипертензии на экспрессию гена водного канала AQP4 в гипоталамусе – центре регуляции висцеральных функций. Показано, что уровень мРНК *Aqp4* у гипергидратированных животных более чем в 1.5 раза ниже, чем у животных с водной депривацией. Такое изменение экспрессии гена *Aqp4* в гипоталамусе может быть связано с возможностью предотвращения цитотоксического отека при повышенном поступлении жидкости в организм. Крысы с наследственной артериальной гипертензией характеризуются повышенным уровнем мРНК *Aqp4* в гипоталамусе, что позволяет предполагать вовлеченность этого канала в процессы, связанные с особенностями регуляции водного баланса мозга при артериальной гипертензии и предотвращения вазогенного отека. Таким образом, представительство водного канала AQP4 в мозге, связанное с защитой клеток мозга, функционально обусловлено состоянием организма, о чем могут свидетельствовать разнонаправленные изменения экспрессии гена *Aqp4* при гипергидратации и артериальной гипертензии.

Ключевые слова: AQP4, экспрессия генов, гипоталамус, водная депривация, гипергидратация, артериальная гипертензия

DOI: 10.31857/S0869813924030117, **EDN:** COYXCH

ВВЕДЕНИЕ

Регуляция водно-солевого обмена является важнейшей гомеостатической функцией организма. Молекулярные механизмы трансмембранного движения воды находятся под пристальным вниманием исследователей. Еще в середине прошлого века было показано существование водных пор, пронизывающих липидный бислой [1, 2]. Прогресс в изучении молекулярной природы водных каналов был достигнут после открытия внутримембранного белка CHIP-28 (channel-forming integral protein, 28 kDa). В дальнейшем CHIP-28 был функционально идентифицирован как белок водных каналов и назван аквапорином-1 (AQP1) [3, 4]. У человека было клонировано и охарактеризо-

вано 13 аквапоринов. Нумерация аквапоринов, начиная с AQP1, связана с последовательностью их идентификации [5].

Аквапорины (AQPs) представляют собой гидрофобные мембранные белки. Эти белки имеют внутриклеточные N- и C-концевые участки, 6 трансмембранных доменов и 5 петель, две из которых участвуют в формировании поры канала. В мембране аквапорины формируют гомотетрамеры, при этом каждый мономер образует собственную функциональную водную пору [6]. В зависимости от структуры и проницаемости у млекопитающих в настоящее время различают три подсемейства аквапоринов: 1) строго специфичные AQP (AQP0, 1, 2, 4, 5, 6 и 8), проницаемы только для воды; 2) «акваглицеропорины» (AQP3, 7, 9 и 10), проницаемы для воды, глицерина и некоторых небольших растворенных веществ; 3) «супераквапорины» (AQP11, AQP12), проницаемы для воды, глицерина и перекиси водорода [5, 7]. Транспорт воды и небольших растворенных веществ через клеточную мембрану с участием аквапоринов управляется осмотическим или концентрационным градиентом [6, 8]. Основная роль аквапоринов – поддержание водного баланса в клетках и тканях организма [6, 9].

Важное физиологическое и клиническое значение имеет водный гомеостаз головного мозга. Преобладающим аквапорином головного мозга является аквапорин-4 (aquaporin-4, AQP4). AQP4 наиболее распространен в астроцитах и эпендимальных клетках, выстилающих желудочки, с наибольшей экспрессией на периваскулярных концах астроцитов, которые окружают кровеносные сосуды [10, 11]. Такое распределение предполагает участие AQP4 в двустороннем движении воды между кровью и паренхимой мозга, а также между паренхимой мозга и спинномозговой жидкостью [6, 8, 12]. По мнению ряда исследователей, AQP4 является важной частью гематоэнцефалического барьера, а его основная роль в центральной нервной системе заключается в поддержании водного баланса клеток мозга [13–15]. Имеется большое количество работ, указывающих на важное значение этого водного канала при цереброваскулярных [16, 17] и нейродегенеративных [18, 19] заболеваниях. Однако роль AQP4 в поддержании водного баланса мозга при физиологических воздействиях, приводящих к изменению водно-солевого обмена, таких как алиментарная гипо- (водная депривация) и гипергидратация, не исследовалась, хотя изменения водного режима (водная депривация или гипергидратация) могут привести к изменениям функционирования водного канала AQP4 в структурах мозга.

Нарушение водно-солевого баланса может наблюдаться при ряде заболеваний, в частности, при артериальной гипертензии [20–22]. Признанной в мире оригинальной моделью гипертонической болезни человека является линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) [23, 24], полученная путем многолетнего отбора в Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск) [25]. Известно, что у крыс линии НИСАГ в почках наблюдается изменение экспрессии некоторых генов, белки которых участвуют в контроле водно-электролитного баланса [22]. Как упоминалось выше, поддержание водного баланса клеток и тканей осуществляется в том числе с участием водного канала AQP4, который у крыс с наследственной стресс-индуцированной артериальной гипертензией (НИСАГ) ранее не исследовался.

Важнейшим отделом головного мозга, участвующим в регуляции целого ряда вегетативных функций, в том числе осморегуляции и кровяного давления – является гипоталамус. Можно предположить, что изменение водного режима у животных, а также состояние повышенного артериального давления приведут к изменениям количества AQP4 в гипоталамусе, что, в свою очередь, должно найти отражение в изменении экспрессии гена, кодирующего этот канал.

Таким образом, целью настоящего исследования являлась оценка экспрессии гена водного канала AQP4 в гипоталамусе – центре регуляции висцеральных функций при изменении водного режима (водной депривации и гипергидратации) и при наследственной артериальной гипертензии у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные серии

*1. Влияние водной депривации и гипергидратации на экспрессию гена *Aqp4* в гипоталамусе крыс.* Эксперименты выполнялись на самцах крыс линии Wistar ($n = 30$) в возрасте 3-х месяцев и массой тела 250–300 г. В течение эксперимента (6 дней) животные содержались в индивидуальных клетках при температуре окружающей среды 22–24°C и 12-часовом цикле темноты/света. На седьмые сутки животные были выведены из эксперимента путем декапитации, после чего забирался биологический материал (кровь – для определения осмоляльности плазмы, гипоталамус – для ПЦР анализа).

Группы животных. Контроль ($n = 10$). Животные контрольной группы имели свободный доступ к воде и сухому корму. На протяжении эксперимента контролировалось количество выпитой воды в сутки. *Водная депривация* ($n = 10$). В течение первых трех дней животные находились в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму, а далее в течение трех дней были лишены воды и питались только сухим кормом. *Гипергидратация* ($n = 10$). Животные лишались твердой пищи на 6 дней. Вместо сухого корма без ограничения животным предлагался 4%-ный раствор сахарозы. На протяжении эксперимента контролировалось количество выпитого раствора сахарозы в сутки.

Регистрируемые параметры. Количество потребляемой жидкости регистрировали ежедневно в двух группах животных – «контроль» и «гипергидратация». Регистрация производилась гравиметрически (Scout Pro SPU601; OHAUS Corporation).

Осмоляльность плазмы крови определяли криоскопическим методом на осмометре ОСКР-1М (КИВИ-осмометрия, РФ).

*2. Влияние артериальной гипертензии на экспрессию гена *Aqp4* в гипоталамусе крыс.* Исследование проводилось на самцах крыс нормотензивной линии WAG (Wistar Albino Glaxo) ($n = 10$) и линии с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) ($n = 10$). Возраст животных 4–6 месяцев, масса тела 300–400 г. Животные содержались группами по 5 особей в клетке (590×380×200 мм) при температуре окружающей среды 22–24°C, с 12-часовым циклом темноты/света, со свободным доступом к корму и воде. Контроль артериального давления осуществлялся по ранее описанной методике [26]. Среднее артериальное давление для крыс НИСАГ и WAG составило 174.5 ± 1.5 и 123.5 ± 2.2 мм рт. ст. ($p < 0.001$) соответственно. Интактные животные были эвтаназированы путем декапитации, после чего забирался биологический материал (гипоталамус – для ПЦР анализа).

Взятие структур мозга для ПЦР анализа. После декапитации мозг крысы быстро извлекали на леду и выделяли гипоталамус, предварительно удалив перекрест зрительных нервов и гипофиз. Область гипоталамуса, включающую *tuber cinereum* с преоптической частью и маммиллярными телами, изолировали вертикальным сечением до глубины ≈ 1.5 мм. Гипоталамус разделяли на переднюю и заднюю части путем сечения посередине образца. Пробы, помещенные в стерильные пробирки, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до выделения суммарной РНК.

Определение экспрессии генов. Экспрессию генов определяли количественным методом ОТ-ПЦР, подробно описанным ранее [27–29]. Выделение РНК осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции [30] с использованием «TRIzol Reagent» (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) согласно протоколу производителя. Возможные следы геномной ДНК удаляли путем обработки ДНКазой «RQ1 RNase-Free DNase» (Promega, Madison, WI, США) в соответствии с протоколом производителя. Для проверки наличия геномной ДНК в пробах проводили ПЦР с праймерами к гену триптофангидроксилазы 1 (*Tph1*), который не экспрессируется в головном мозге [31, 32].

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности и характеристики праймеров, использованных для определения уровня мРНК *Aqp4* в гипоталамусе крыс

Ген	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °C	Количество циклов амплификации	Размер ПЦР-продукта (пар нуклеотидов)
<i>Aqp4</i>	F 5'-ATCAGCATCGCCAAGTCCGT R 5'-GCCAGCAGTGAGGTTCCA	66	42	144
<i>Ppia</i>	F 5'-TTCCAGGATTCATGTGCCAG R 5'-CTTGCCATCCAGCCACTC	64	40	206
<i>Polr2a</i>	F 5'-GCCTGACTTTGATGTAGCCC R 5'-ATCCACCACCTCTTCCTCCT	64	40	235
<i>Tph1</i>	F 5'-GAAAGTATTTTCGCAGAGCTGG R 5'-GGCGTGGGTTGGGTAGAGTTTGT	66	36	283 с интроном 134 без интрона
<i>Внутриэкзонные праймеры</i>				
<i>Aqp4</i>	F 5'-CAGAGAACCCCTACCTGTG R 5'-CGCAGTGATGTAGAAGACGGA	66	28	179
<i>Polr2a</i>	F 5'-TTGTCGGGCAGCAGAACGTG R 5'-CAATGAGACCTTCTCGTCTCCCC	64	29	186
<i>Ppia</i>	F 5'-CCGACTGTGGACAACCTCTAAT R 5'-ACTTGAAGGGGAATGAGGAAA	61.5	26	168

Примесей геномной ДНК в пробах обнаружено не было. Все праймеры, использованные в настоящем анализе, были разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных European Molecular Biology Laboratory (EMBL) и синтезированы в компании «БИОСЦЕТ» (Новосибирск, Россия). Нуклеотидные последовательности и характеристики праймеров представлены в табл. 1.

ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе LightCycler-480 II (Roche, Швейцария). Реакционная смесь содержала мастер-микс с SYBR Green (BioMaster HS-qPCR SYBR Blue(2x), Биоллабмикс, Новосибирск), прямой и обратный праймеры и матрицу кДНК. Применяли метод количественного определения стандартных кривых [33]: относительное количество кДНК определяли с использованием калибровочных кривых, полученных по разведениям стандартной кДНК (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 и 1:128). Стандартный раствор кДНК для построения калибровочных кривых готовили путем смешивания аликвот каждого образца синтезированной кДНК. Программное обеспечение LightCycler-480 (Roche, Швейцария) использовали для построения калибровочных кривых и расчета относительного количества кДНК в образцах. Для получения результата в «количестве копий исследуемого гена на 100 копий гена домашнего хозяйства» мы провели количественную оценку количества копий исследуемого гена и гена домашнего хозяйства в стандартном растворе кДНК, используя геномную ДНК известной концентрации в качестве внешнего стандарта [34, 35] и внутриэкзонные праймеры. Каждое значение, необходимое для характеристики экспрессии

Таблица 2. Уровень мРНК гена *Polr2a* (ng/μl) в переднем и заднем гипоталамусе крыс при разных режимах водной нагрузки

Экспериментальные группы	Передний гипоталамус	Задний гипоталамус
Контроль ($n = 10$)	2.43 ± 0.73	3.14 ± 0.29
Водная депривация ($n = 10$)	1.48 ± 0.45	3.35 ± 0.17
Гипергидратация ($n = 10$)	2.84 ± 0.79	3.67 ± 0.39

Для переднего гипоталамуса $F_{1,27} = 1.07$, $p = 0.35$.

Для заднего гипоталамуса $F_{1,27} = 0.81$, $p = 0.45$.

генов, получали в трех повторах. Уровень экспрессии гена водного канала AQP4 представлен как количество копий мРНК гена *Aqp4* на 100 копий мРНК гена домашнего хозяйства (ген ДНК-зависимой РНК-полимеразы II (*Polr2a*) или ген пептидил-пролил цис-транс изомеразы A (*Ppia*)).

Статистика. Для статистического анализа использовали пакет программ Statistica 8 (StatSoft, Россия) и программу Microsoft Excel. Статистическую обработку результатов проводили с помощью t-критерия Стьюдента, однофакторного и многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с применением критерия Фишера при сравнении показателей нескольких экспериментальных групп. Различие считали достоверным при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Влияние водной депривации и гипергидратации на экспрессию гена *Aqp4* в гипоталамусе крыс

Количество потребляемой жидкости. В контрольной группе среднее количество потребляемой жидкости в сутки составляло 35.0 ± 1.3 мл. В группе гипергидратации этот показатель был выше в 4 раза ($p = 0.00002$, $t = -14.24$) и составил 138.5 ± 7.2 мл. Животные с водной депривацией не получали воду в течение последних 3 дней.

Осмоляльность плазмы крови. Осмоляльность плазмы крови составила 258.5 ± 10.2 , 276.9 ± 7.3 , 231.9 ± 12.3 мОсм/кг H_2O для групп контроля, водной депривации и гипергидратации соответственно. Этот показатель у животных экспериментальных групп достоверно не отличался от показателя у животных контрольной группы. Однако у гипергидратированных животных осмоляльность плазмы была достоверно ниже, чем у животных с водной депривацией ($F_{2,24} = 4.85$, $p = 0.005$).

Экспрессия гена водного канала AQP4. В качестве эндогенного стандарта при сравнении показателей разных экспериментальных групп использовали ген ДНК-зависимой РНК-полимеразы II (*Polr2a*). Различий в уровне мРНК *Polr2a* между экспериментальными группами обнаружено не было (табл. 2).

В обоих отделах гипоталамуса отмечается довольно высокий уровень экспрессии гена *Aqp4*, превышающий уровень экспрессии гена «домашнего хозяйства». Уровень мРНК *Aqp4* в группах водной депривации и гипергидратации не отличался от контроля и составил: 1) для переднего отдела гипоталамуса 3996.2 ± 838.0 , 4422.5 ± 823.9 и 2461.8 ± 449.3 копий/100 копий *Polr2a* ($F_{1,27} = 2.02$, $p = 0.68$, $p = 0.15$) для групп контроля, водной депривации и гипергидратации соответственно. При сравнении уровня мРНК *Aqp4* у животных контрастных групп достоверных различий обнаружено не было ($F_{1,27} = 2.02$, $p = 0.067$); 2) для заднего отдела гипоталамуса – 1384.5 ± 209.6 , 1600.3 ± 155.1 , 943.9 ± 131.5 копий/100 копий *Polr2a* ($F_{1,26} = 3.86$, $p = 0.38$, $p = 0.07$) для групп контроля, водной депривации и гипергидратации соответственно. Однако при

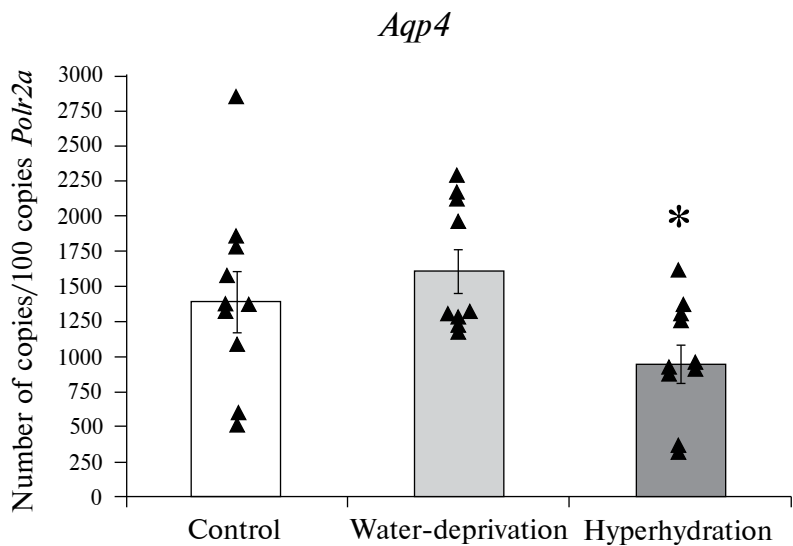


Рис. 1. Влияние питьевого режима (водной депривации и гипергидратации) на экспрессию гена *Aqp4* в заднем гипоталамусе крыс. * – достоверные различия между группами водной депривации и гипергидратации, $p < 0.05$. Индивидуальные значения представлены на рисунке треугольниками.

Таблица 3. Уровень мРНК гена *Ppia* (ng/μl) в переднем и заднем гипоталамусе нормотензивных (WAG) и гипертензивных (НИСАГ) крыс

Линия животных	Передний гипоталамус	Задний гипоталамус
WAG ($n = 10$)	0.62 ± 0.08	0.58 ± 0.08
НИСАГ ($n = 10$)	0.49 ± 0.08	0.55 ± 0.08

Фактор «линия животных» $F_{1,35} = 1.25, p = 0.27$.
Фактор «отдел гипоталамуса» $F_{1,35} = 0.03, p = 0.86$.
Взаимодействие факторов «линия животных» и «отдел гипоталамуса» $F_{1,35} = 0.36, p = 0.55$.

сравнении уровня мРНК *Aqp4* у животных контрастных групп обнаружено, что этот показатель в заднем отделе гипоталамуса у гипергидратированных животных более чем в 1.5 раза ниже ($F_{1,26} = 3.86, p = 0.012$), чем у животных с водной депривацией (рис. 1).

2. Влияние артериальной гипертензии на экспрессию гена *Aqp4* в гипоталамусе крыс

В качестве эндогенного стандарта при сравнении показателей разных экспериментальных групп использовали ген пептидил-пролил цис-транс изомеразы А (*Ppia*). Различий в уровне мРНК *Ppia* не было обнаружено ни между линиями животных, ни между отделами гипоталамуса (табл. 3).

У крыс нормотензивной линии WAG обнаружены различия в уровне мРНК *Aqp4* между отделами гипоталамуса ($p = 0.022, t = -2.53$). Уровень мРНК *Aqp4* в переднем отделе гипоталамуса оказался ниже, чем в заднем, и составил соответственно: 222.7 ± 7.6 и 256.1 ± 11.1 копий/100 копий *Ppia* (рис. 2).

У крыс с артериальной гипертензией не обнаружено различий в уровне мРНК *Aqp4* между передним и задним отделами гипоталамуса ($p = 0.14, t = -1.56$). Уровень мРНК

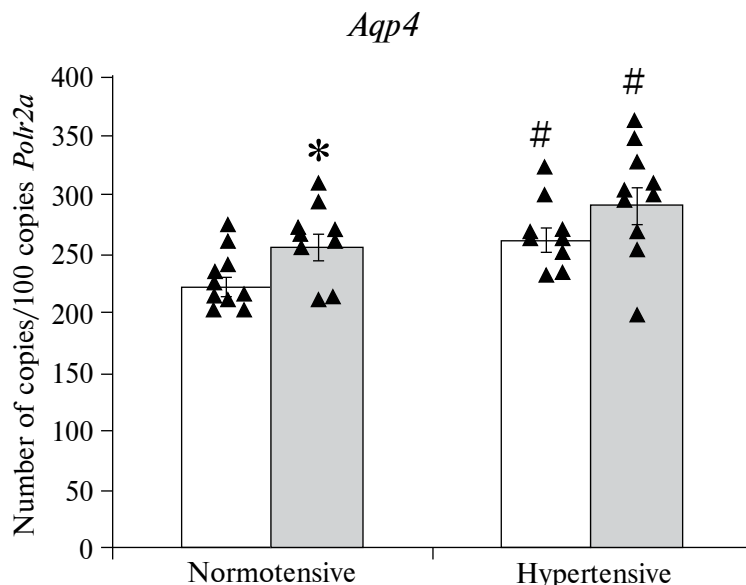


Рис. 2. Экспрессия гена *Aqp4* в переднем (белые столбцы) и заднем (серые столбцы) гипоталамусе нормо- и гипертензивных крыс. * – достоверные различия между отделами гипоталамуса; # – достоверные различия между нормо- и гипертензивными животными, $p < 0.05$. Индивидуальные значения представлены на рисунке треугольниками.

Aqp4 составил 261.9 ± 9.9 и 291.5 ± 15.5 копий/100 копий *Ppia* для переднего и заднего отделов соответственно.

Сравнение уровня мРНК водного канала AQP4 в гипоталамусе у нормо- и гипертензивных животных показало, что у крыс линии НИСАГ этот показатель выше, чем у крыс линии WAG как в переднем, так и в заднем отделах гипоталамуса ($F_{1,34} = 10.48$, $p = 0.022$, $p = 0.037$ для переднего и заднего отделов соответственно) (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время AQP4 рассматривается в качестве основного канала, регулирующего водный гомеостаз головного мозга. Показано, что он является также важной частью гематоэнцефалического барьера [13–15] и лимфатической системы мозга [12, 18, 36]. Это подтверждается в том числе его высокой экспрессией на астроцитах, которые окружают кровеносные сосуды, и в эпендимальных клетках, выстилающих желудочки мозга [10, 11]. В настоящем исследовании мы обнаружили очень высокий уровень экспрессии гена *Aqp4* в гипоталамусе, превышающий уровень гена «домашнего хозяйства», что также указывает на важную роль этого водного канала в мозге.

При исследовании влияния изменения питьевого режима на экспрессию гена *Aqp4* было показано, что у гипергидратированных животных уровень мРНК *Aqp4* в гипоталамусе более чем в 1.5 раза ниже, чем у животных с водной депривацией. Животные, подверженные изменению питьевого режима, действительно находились в контрастных физиологических состояниях по уровню гидратированности организма. Это подтверждается как уровнем потребления воды (гипергидратированные животные потребляли жидкости в 4 раза больше, чем контрольные), так и осмоляльностью плазмы крови (у гипергидратированных животных она была достоверно ниже, чем у животных с водной депривацией). Известно, что одним из видов гипергидратации являет-

ся гипоосмолярная гипергидратация, характеризующаяся снижением осмоляльности плазмы крови. При этом избыточная вода обычно перемещается из внеклеточного пространства в клетку, что может приводить к цитотоксическому отеку [37, 38]. Не исключено, что обнаруженное в наших экспериментах снижение экспрессии гена *Aqp4* в гипоталамусе необходимо для предотвращения возможного цитотоксического отека при гипергидратации.

Исследование роли аквапоринов существенно осложняется отсутствием специфических лигандов к ним [11, 16]. Поэтому при изучении роли AQP4 в мозге преимущественно применяют генетические модели: мышей с нокаутом по гену этого водного канала [19, 37, 39–41] или, напротив, с его повышенной экспрессией [42]. Manley и соавт. [37, 43], исследуя роль AQP4 в патогенезе отека головного мозга на модели водной интоксикации (быстрое внутрибрюшинное введение воды в объеме 20% от массы тела), обнаружили, что у мышей с нокаутом по гену аквапорина-4 (*Aqp4*^{-/-}) цитотоксический отек не развивается в отличие от мышей дикого типа (*Aqp4*^{+/+}). Еще в одной модели цитотоксического отека – при остром бактериальном менингите у мышей с дефицитом *Aqp4* наблюдалось пониженное содержание воды в мозге [44]. При повышенной экспрессии *Aqp4* у животных было отмечено ускоренное прогрессирование цитотоксического отека головного мозга после острой водной интоксикации [42]. Таким образом, изменение количества AQP4 в различных моделях цитотоксического отека может быть функционально значимо за счет изменения направления транспорта воды в тканях мозга. Возможно, что показанное нами снижение экспрессии гена *Aqp4* в гипоталамусе у животных, подверженных гипергидратации, направлено именно на предотвращение возникновения цитотоксического отека, замедляя поступление воды в клетки мозга.

Необходимо отметить, что уровень мРНК *Aqp4* у животных с водной депривацией сопоставим по этому показателю с животными контрольной группы. Аквапорин-4 играет ключевую роль в транспорте воды, в связи с этим он рассматривается как основной водный канал, участвующий в развитии и устранении отеков головного мозга. Работ, посвященных изменению AQP4 в условиях водной депривации, крайне мало. Нами была найдена лишь одна работа [45], в которой было показано, что 2-дневная водная депривация у цыплят приводила к достоверному увеличению мРНК *Aqp4* в гипоталамусе относительно контрольной группы. В наших исследованиях на взрослых крысах не было обнаружено подобных изменений экспрессии гена *Aqp4*. Возможно, имеются видовые и возрастные различия в чувствительности гена *Aqp4* к недостатку потребления воды.

При исследовании влияния артериальной гипертензии на экспрессию гена *Aqp4* было обнаружено, что крысы с наследственной артериальной гипертензией характеризуются повышенным уровнем мРНК *Aqp4* в гипоталамусе в сравнении с нормотензивными крысами. Известно, что артериальная гипертензия сопровождается изменениями водно-электролитного гомеостаза. У крыс линии НИСАГ показано нарушение функции почек – органа, который, как известно, контролирует баланс натрия, объем циркулирующей крови и внеклеточной жидкости и т. д., в целом обеспечивая водно-солевой баланс организма. При этом в почке у животных линии НИСАГ отмечаются как морфологические изменения, например, уплотнение эпителия, гипертрофия подоцитов и гиперплазия их мембранных структур, утолщение базальных мембран и т. д. [46, 47], так и изменения уровня мРНК генов *Mlr* и β -*ENaC*, белки которых участвуют в контроле водно-электролитного баланса организма [22]. Согласно литературным данным, у взрослых крыс линии НИСАГ содержание воды в некоторых органах повышено по сравнению с крысами Wistar. Это повышение отмечено в печени, почках, сердце, мышцах, а также в головном мозге [20].

Помимо этого, существуют данные, что выраженная артериальная гипертензия может способствовать развитию отека мозга, в том числе вазогенного [15, 48]. Вазоген-

ный отек характеризуется повышенной проницаемостью капилляров головного мозга, в результате происходит повышение в ткани уровня внеклеточной жидкости [49]. Не исключено, что повышенный уровень экспрессии гена *Aqp4* в гипоталамусе гипертонивных крыс НИСАГ необходим для поддержания водного баланса головного мозга в состоянии повышенного уровня воды и предотвращения опасности вазогенного отека тканей мозга. Подтверждением этого предположения могут быть данные литературы, свидетельствующие о существенном повышении реабсорбции воды из ткани в кровеносное русло при увеличении уровня AQP4 [39]. Авторы данного исследования обнаружили, что нокаут по гену *Aqp4* у мышей может приводить к увеличению воды в паренхиме мозга в различных моделях вазогенного отека мозга (интрапаренхиматозной инфузии жидкости, повреждения гематоэнцефалического барьера и опухоли мозга) в сравнении с мышами дикого типа. Большее накопление воды в мозге у мышей *Aqp4*^{-/-} является следствием снижения переноса воды из паренхимы головного мозга в сосудистое, внутрижелудочковое и субарахноидальное пространство [39].

Интересно, что у крыс со спонтанной гипертензией SHR в структурах мозга (лобная кора, стриатум и гиппокамп) также был обнаружен повышенный уровень AQP4 в сравнении с нормотонивными крысами WKY [14, 15]. Гипоталамус в этих работах не исследовался. Линия SHR, как и линия НИСАГ (объект настоящего исследования), характеризуется повышенным содержанием воды в мозге [50]. На основе наших и литературных данных можно высказать предположение, что повышенный уровень AQP4 в структурах мозга, как и повышенная экспрессия гена этого белка, являются одним из характерных признаков артериальной гипертензии и необходимы, по-видимому, для предотвращения вазогенного отека клеток мозга.

Таким образом, водный канал AQP4 играет важную роль в функционировании мозга, а разнонаправленный характер транспорта воды, обеспечиваемого AQP4, может быть связан с клинически значимыми механизмами формирования и устранения отека мозга. Представительство водного канала AQP4 в мозге, связанное с защитой нервных клеток, функционально обусловлено состоянием организма, о чем могут свидетельствовать показанные в настоящем исследовании разнонаправленные изменения экспрессии гена *Aqp4* при гипергидратации и артериальной гипертензии.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея и планирование эксперимента, окончательное утверждение версии манускрипта для публикации (Т. В. К.), сбор и обработка данных (А. А. Е., И. В. О., И. П. В.), написание и редактирование манускрипта (А. А. Е., И. П. В.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований Научно-исследовательского института нейронаук и медицины (тема № 122042700001-9). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Научно-исследовательского института нейронаук и медицины. Протокол № 3-О от 18 марта 2021 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Koefoed-Johnsen V, Ussing HH* (1958) The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol Scand* 42: 298–308.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1958.tb01563.x>
2. *Macey RI, Farmer REL* (1970) Inhibition of water and solute permeability in human red cells. *Biochim Biophys Acta* 211: 104–106.
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(70\)90130-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(70)90130-6)
3. *Preston GM, Agre P* (1991) Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: Member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 11110–11114.
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11110>
4. *Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, Moon C, Guggino WB, Nielsen S* (1993) Aquaporin CHIP: The archetypal molecular water channel. *Am J Physiol Physiol* 265: 463–476.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1993.265.4.F463>
5. *Trillo-Contreras JL, Ramírez-Lorca R, Villadiego J, Echevarría M* (2022) Cellular Distribution of Brain Aquaporins and Their Contribution to Cerebrospinal Fluid Homeostasis and Hydrocephalus. *Biomolecules* 12(4): 530.
<https://doi.org/10.3390/biom12040530>
6. *Verkman AS, Mitra AK* (2000) Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol* 278: 13–28.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.278.1.F13>
7. *Gorelick DA, Praetorius J, Tsunenari T, Nielsen S, Agre P* (2006) Aquaporin-11: A channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. *BMC Biochem* 7: 14.
<https://doi.org/10.1186/1471-2091-7-14>
8. *Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S* (1998) Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11981–11986.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11981>
9. *Carbrey JM, Agre P* (2009) Discovery of the Aquaporins and Development of the Field. *Anxiety Anxiolytic Drugs* 190: 3–28.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_1
10. *Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP* (2003) The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* 4(12): 991–1001.
<https://doi.org/10.1038/nrn1252>. PMID: 14682361
11. *Verkman AS, Smith AJ, Phuan PW, Tradtrantip L, Anderson MO* (2017) The aquaporin-4 water channel as a potential drug target in neurological disorders. *Expert Opin Ther Targets* 21 (12): 1161–1170.
<https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1398236>
12. *Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M* (2012) A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β . *Sci Transl Med* 4: 147ra111–147ra111.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>
13. *Benfenati V, Ferroni S* (2010) Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. *Neuroscience* 168: 926–940.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.12.017>
14. *Tomassoni D, Bramanti V, Amenta F* (2010) Expression of aquaporins 1 and 4 in the brain of spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1325: 155–163.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.02.023>
15. *González-Marrero I, Hernández-Abad LG, González-Gómez M, Soto-Viera M, Carmona-Calero EM, Castañeyra-Ruiz L, Castañeyra-Perdomo A* (2022) Altered Expression of AQP1 and AQP4 in Brain Barriers and Cerebrospinal Fluid May Affect Cerebral Water Balance during Chronic Hypertension. *Int J Mol Sci* 23(20): 12277.
<https://doi.org/10.3390/ijms232012277>
16. *Chu H, Huang C, Ding H, Dong J, Gao Z, Yang X, Tang Y, Dong Q* (2016) Aquaporin-4 and Cerebrovascular Diseases. *Int J Mol Sci* 17(8): 1249.
<https://doi.org/10.3390/ijms17081249>
17. *Peng S, Liu J, Liang C, Yang L, Wang G* (2023) Aquaporin-4 in glymphatic system, and its implication for central nervous system disorders. *Neurobiol Dis* 179: 106035.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106035>
18. *Silva I, Silva J, Ferreira R, Trigo D* (2021) Glymphatic system, AQP4, and their implications in Alzheimer's disease. *Neurol Res Pract* 3(1): 5.
<https://doi.org/10.1186/s42466-021-00102-7>

19. Simon M, Wang MX, Ismail O, Braun M, Schindler AG, Reemmer J, Wang Z, Haveliwala MA, O'Boyle RP, Han WY, Roese N, Grafe M, Woltjer R, Boison D, Iliff JJ (2022) Loss of perivascular aquaporin-4 localization impairs glymphatic exchange and promotes amyloid β plaque formation in mice. *Alzheimers Res Ther* 14(1): 59.
<https://doi.org/10.1186/s13195-022-00999-5>
20. Кушнер СР, Иглина НГ, Маркель АЛ, Маханова НА, Айзман РИ (2001) Водно-солевой состав органов и тканей крыс с наследственной, индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ). *Нефрология* 3: 104 [Kushner SR, Iglina NG, Markel AL, Makhanova NA, Aizman RI (2001) The water-salt composition of organs and tissues of rats with hereditary, stress-induced arterial hypertension (ISIAH). *Nephrology* 3: 104. (In Russ)].
21. Fedoseeva LA, Ryazanova MA, Antonov EV, Dymshits GM, Markel AL (2011) Renin-angiotensin system gene expression in the kidney and in the heart in hypertensive ISIAH rats. *Biomed Chem* 57(4): 410–419.
<https://doi.org/10.18097/pbmc20115704410>
22. Abramova TO, Smolenskaya SE, Antonov EV, Redina OE, Markel AL (2016) Expression of catechol-o-methyltransferase (Comt), mineralocorticoid receptor (Mlr), and epithelial sodium channel (ENaC) genes in kidneys of hypertensive ISIAH rats at rest and during response to stress. *Russ J Genet* 52(2): 180–187.
<https://doi.org/10.1134/S1022795415120029>
23. Rapp JP (2000) Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev* 80: 135–172.
<https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.135>
24. Ryazanova MA, Plekanchuk VS, Prokudina OI, Makovka YV, Alekhina TA, Redina OE, Markel AL (2023) Animal Models of Hypertension (ISIAH Rats), Catatonia (GC Rats), and Audiogenic Epilepsy (PM Rats) Developed by Breeding. *Biomedicines* 11(7): 1814.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines11071814>
25. Markel AL (1992) Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension. In: Sassard J (ed) *Genetic Hypertension. Colloque INSERM John Libbey Eurotext*. London 405–407.
26. Markel AL, Redina OE, Gilinsky MA, Dymshits GM, Kalashnikova EV, Khvorostova YuV, Fedoseeva LA, Jacobson GS (2007) Neuroendocrine profiling in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension. *J Endocrinol* 195: 439–450.
<https://doi.org/10.1677/JOE-07-0254>
27. Voronova IP, Tuzhikova AA, Kozyreva TV (2013) Gene expression of thermosensitive TRP ion channels in the rat brain structures: Effect of adaptation to cold. *J Therm Biol* 38: 300–304.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2013.03.009>
28. Voronova IP, Tuzhikova AA, Markel AL, Kozyreva TV (2015) Inherited stress-induced hypertension associates with altered gene expression of thermosensitive TRP ion channels in hypothalamus. *J Exp Integr Med* 5: 149–156.
<https://doi.org/10.5455/jeim.021015.or.136>
29. Evtushenko AA, Voronova IP, Kozyreva TV (2023) Effect of Long-Term Adaptation to Cold and Short-Term Cooling on the Expression of the TRPM2 Ion Channel Gene in the Hypothalamus of Rats. *Current Issues Mol Biol* 45(2): 1002–1011.
<https://doi.org/10.3390/cimb45020065>
30. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Biochem* 162: 156–159.
<https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
31. Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Horyangl H, Voits M, Fink H, Bader M (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299: 76–84.
<https://doi.org/10.1126/science.1078197>
32. Naumenko VS, Kulikov AV (2006) Quantitative assay of 5-HT(1A) serotonin receptor gene expression in the brain. *Mol Biol* 40: 37–44.
<https://doi.org/10.1134/s0026893306010079>
33. Ginzinger DG (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 30: 503–512.
[https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00806-8](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00806-8)
34. Kulikov AV, Naumenko VS, Voronova IP, Tikhonova MA, Popova NK (2005) Quantitative RT-PCR assay of 5-HT1A and 5-HT2A serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard. *J Neurosci Methods* 141: 97–101.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.06.005>
35. Naumenko VS, Osipova DV, Kostina EV, Kulikov AV (2008) Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain. *J Neurosci Methods* 170: 197–203.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.01.008>

36. *Hubbard JA, Szu JI, Binder DK* (2018) The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease. *Brain Res Bull* 136: 118–129.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.02.011>
37. *Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS* (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 6(2): 159–163.
<https://doi.org/10.1038/72256>
38. *Thiagarajah JR, Papadopoulos MC, Verkman AS* (2005) Non-invasive early detection of brain edema in mice by near-infrared light scattering. *J Neurosci Res* 80: 293–299.
<https://doi.org/10.1002/jnr.20439>
39. *Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS* (2004) Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J* 18(11): 1291–1293.
<https://doi.org/10.1096/fj.04-1723fje>
40. *Verkman AS* (2009) Knock-out models reveal new aquaporin functions. *Handb Exp Pharmacol* (190): 359–381.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_18
41. *Gomolka RS, Hablitz LM, Mestre H, Giannetto M, Du T, Hauglund NL, Xie L, Peng W, Martinez PM, Nedergaard M, Mori Y* (2023) Loss of aquaporin-4 results in glymphatic system dysfunction via brain-wide interstitial fluid stagnation. *Elife* 12: e82232.
<https://doi.org/10.7554/eLife.82232>
42. *Yang B, Zador Z, Verkman AS* (2008) Glial cell aquaporin-4 overexpression in transgenic mice accelerates cytotoxic brain swelling. *J Biol Chem* 283: 15280–15286.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M801425200>
43. *Manley GT, Binder DK, Papadopoulos MC, Verkman AS* (2004) New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice. *Neuroscience* 129(4): 983–991.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.088>
44. *Papadopoulos MC, Verkman AS* (2005) Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem* 280: 13906–13912.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M413627200>
45. *Saito N, Ikegami H, Shimada K* (2005) Effect of water deprivation on aquaporin 4 (AQP4) mRNA expression in chickens (*Gallus domesticus*). *Mol Brain Res* 141(2): 193–197.
<https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.09>
46. *Шмерлинг МД, Филюшина ЕЕ, Лазарев ВА, Бузueva ИИ, Маркель АЛ, Якобсон ГС* (2001) Ультраструктурные особенности почечных телец у крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией. *Морфология* 120 (6): 70–74. [*Shmerling MD, Filyushina EE, Lazarev VA, Buzueva II, Markel AL, Yakobson GS* (2001) Ultrastructural characteristics of renal corpuscles in rats with hereditary stress-induced arterial hypertension. *Morphology* 120 (6): 70–74. (In Russ)].
47. *Filyushina EE, Shmerling MD, Buzueva II, Lazarev VA, Yakobson GS, Markel AL* (2013) Structural characteristics of renomedullary interstitial cells of hypertensive ISIAH rats. *Bull Exp Biol Med* 155(3): 408–412.
48. *Hatashita S, Hoff JT, Ishii S* (1986) Focal brain edema associated with acute arterial hypertension. *J Neurosurg* 64(4): 643–649.
<https://doi.org/10.3171/jns.1986.64.4.0643>
49. *Michinaga S, Koyama Y* (2015) Pathogenesis of brain edema and investigation into anti-edema drugs. *Int J Mol Sci* 16(5): 9949–9975.
<https://doi.org/10.3390/ijms16059949>
50. *Naessens DMP, Coolen BF, de Vos J, VanBavel E, Strijkers GJ, Bakker ENTP* (2020) Altered brain fluid management in a rat model of arterial hypertension. *Fluids Barriers CNS* 17(1): 41.
<https://doi.org/10.1186/s12987-020-00203-6>

Functional Changes in the Expression of the *Aqp4* Gene in the Hypothalamus Under the Influence of Drinking Regimen and Arterial Hypertension in Rats**A. A. Evtushenko^{a,*}, I. V. Orlov^{a,b}, I. P. Voronova^a, and T. V. Kozyreva^{a,b}**^a*Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia*^b*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;*** e-mail: evtushenkoaa@neuronm.ru*

Aquaporin-4 (AQP4) is the main water channel in the central nervous system. AQP4 is densely expressed in brain structures suggesting a crucial role in water transport in normal conditions and in disease. The effect of changes in drinking regime (water-deprivation and hyperhydration) and inherited arterial hypertension on the expression of the AQP4 water channel gene in the hypothalamus, the center of regulation of visceral functions, was studied. It was shown that the level of the *Aqp4* mRNA in hyperhydrated animals more than 1.5 times lower than in animals with water-deprivation. This decrease in the *Aqp4* gene expression in the hypothalamus may be associated with the ability to prevent cytotoxic edema during increased fluid intake. Rats with inherited stress induced arterial hypertension (ISIAH) are characterized by an increased level of *Aqp4* mRNA in the hypothalamus, which suggests the involvement of this channel in processes associated with the regulation of brain water balance during arterial hypertension and the prevention of vasogenic cerebral edema. Thus, the presence of the AQP4 water channel in the brain, associated with the protection of brain cells, is functionally determined by the state of the body. This may be evidenced by bidirectional changes in the *Aqp4* gene expression during hyperhydration and arterial hypertension.

Keywords: AQP4, gene expression, hypothalamus, water-deprivation, hyperhydration, hypertension