

**Анализ экспрессии субъединиц НАДФН-оксидазы в культуре эндотелиоцитов при воздействии N-nitro-L-arginine**

**Научный руководитель – Митрошина Ирина Юрьевна**

**Грачева Анастасия Игоревна**

*Студент (бакалавр)*

Рязанский государственный университет имени С.А. Есенина,  
Естественно-географический факультет, Рязань, Россия

*E-mail: anastasia.grasceva@mail.ru*

При сахарном диабете 2 типа (СД2Т) в условиях гипергликемии в эндотелиоцитах нарастает продукция активных форм кислорода (АФК), что усугубляет течение заболевания и способствует прогрессированию диабетических осложнений. Одним из источников АФК в эндотелиальных клетках является мембранный мультиструктурный ферментный комплекс НАДФН-оксидаза. Ингибирование НАДФН-оксидазы осуществляется с помощью некоторых химических агентов, включающих оксид азота (NO), который синтезируется ферментативным комплексом eNOS из L-аргинина и кислорода. Однако N-nitro-L-arginine (L-NNA) действует как блокатор eNOS, что приводит к снижению ингибирования НАДФН-оксидазы. Снижение уровня NO из-за действия L-NNA ведет к уменьшению его сосудорасширяющего эффекта и к дисфункции эндотелия.

Целью работы было оценить воздействие L-NNA на уровень экспрессии генов gp91phox, p47phox, p67phox субъединиц НАДФН-оксидазы в эндотелиоцитах, культивируемых в условиях гипергликемии.

Эндотелиоциты микрососудов кожи мыши изолировали из фрагментов дермы хвоста методом седиментации на градиенте плотности перколла. Клетки инкубировали при концентрации глюкозы в среде 22 мМ (гипергликемия) или 5,5 мМ (контроль), и с добавлением L-NNA в течение 24 ч при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.

Анализ экспрессии генов проводили с помощью ОТ-ПЦР-РВ. Амплификация и детекция результатов была проведена на амплификаторе DT light 4 («НПО ДНК-Технология», Россия). Данные представлены в виде медианных значений  $\pm$  SD. Достоверность результатов оценивали с помощью Mann–Whitney U-test ( $p \leq 0.05$ ).

В результате анализа данных с помощью относительной количественной оценки ( $\Delta\Delta Ct$  method) обнаружено, что экспрессия гена CybB, выявляемая в культуре эндотелиоцитов мыши, культивируемых в условиях гипергликемии ( $1,2 \pm 0,48$ ,  $n=5$ ), увеличилась, по сравнению с нормогликемией ( $0,13 \pm 0,068$ ,  $n=3$ ). При введении в культуру L-NNA экспрессия CybB в условиях нормо- ( $0,13 \pm 0,15$ ,  $n=5$ ), так и гипергликемии ( $0,08 \pm 0,03$ ,  $n=4$ ) осталась на уровне контрольного значения.

Уровень экспрессии NCF1 в условиях гипергликемии ( $18 \pm 8$ ,  $n=5$ ) значительно превышал значения нормогликемии ( $0,57 \pm 0,4$ ,  $n=4$ ). При введении в культуру L-NNA экспрессия NCF1 в условиях нормо- ( $0,14 \pm 0,2$ ,  $n=4$ ), так и гипергликемии ( $0,13 \pm 0,09$ ,  $n=3$ ) осталась на уровне контрольного значения.

Анализ экспрессии гена NCF2 показал, что уровень экспрессии, выявляемой в культуре эндотелиоцитов условиях нормогликемии ( $4,4 \pm 3,4$ ,  $n=5$ ) достоверно не отличался от уровня экспрессии этого гена, выявляемого в культуре эндотелиоцитов мыши, культивируемых в условиях гипергликемии ( $0,9 \pm 1$ ,  $n=5$ ). При введении в культуру L-NNA экспрессия NCF2 в условиях нормогликемии ( $0,65 \pm 1$ ,  $n=6$ ) осталась на уровне контрольного значения, тогда как при гипергликемии ( $0,07 \pm 0,1$ ,  $n=4$ ) существенно снизилась по сравнению с контролем. Проведенные нами исследования показали, что в условиях гипергликемии добавление L-

NNA в среду понижает уровень экспрессии субъединиц НАДФН-оксидазы в эндотелиоцитах микрососудов кожи мыши, что может представлять собой адаптивный механизм, позволяющий регулировать активность НАДФН-оксидазного комплекса.