
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**НОКАУТ ГЕНА *nos3* У МЫШЕЙ ПОВЫШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ
ПОЧЕК К ФУРОСЕМИДУ**

© 2025 г. А. В. Кутина^{1,2,*}, Г. В. Беляков^{1,2}, Е. В. Балботкина¹,

А. В. Чиринскайт², Ю. В. Сопова², Е. И. Леонова²

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова*

Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

²*Центр трансгеноза и редактирования генома, Санкт-Петербургский государственный
университет, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: kutina_anna@mail.ru*

Поступила в редакцию 23.01.2025 г.

После доработки 14.03.2025 г.

Принята к публикации 26.03.2025 г.

Оксид азота (NO) регулирует почечную гемодинамику и ингибирует канальцевую реабсорбцию натрия. Образование NO катализируется NO-синтазами (NOS), актуально изучение роли отдельных NO-синтаз в реализации функций почек. Цель исследования – получение линии мышей с нокаутом гена *nos3* (NOS KO) и оценка у них ионорегулирующей функции почек. Чистая линия мышей NOS KO выведена на основе линии мышей C57Bl/6 с использованием метода CRISPR-Cas9-редактирования. В физиологическое исследование было включено 39 животных (10 самок и 10 самцов мышей C57Bl/6; 10 самок и 9 самцов мышей NOS KO), генотипирование выполнено в возрасте 4 недель методами ПЦР и секвенирования. Для выявления отличий в транспорте натрия и калия в почках у мышей NOS KO были проведены эксперименты с оценкой экскреции ионов у животных при поении водой (контроль), при нагрузке NaCl (7.7 мкмоль/г) и введении петлевого диуретика. В контроле у мышей NOS KO и C57Bl/6 не выявлено различий в экскреции ионов натрия и калия. В условиях поступления избытка NaCl также не выявлено существенных межлинейных различий: экскреция натрия и калия возросла в 8.8 и 1.3 раза у мышей NOS KO и в 8.4 и 1.7 раза у мышей дикого типа соответственно. Натрийуретический эффект фуросемида (5 мкг/г) у мышей NOS KO был сильнее, чем у мышей C57Bl/6. Экскреция натрия почками составила 4.1 ± 0.3 мкмоль/г за 2 ч наблюдения у мышей NOS KO и 2.7 ± 0.2 мкмоль/г у мышей дикого типа ($p < 0.001$). Таким образом, в работе впервые выявлено повышение чувствительности к фуросемиду у мышей с нокаутом гена *nos3*, что может указывать на значимость активности эндотелиальной NO-синтазы для регуляции транспорта натрия в толстом восходящем отделе петли Генле.

Ключевые слова: эндотелиальная NO-синтаза, нокаут гена *nos3*, мышь, натрийурез, фуросемид, почка, экскреция ионов

DOI: 10.31857/S0869813925050107, **EDN:** TMYTNY

ВВЕДЕНИЕ

Оксид азота (NO) как физиологически активное вещество принимает участие в регуляции почечной гемодинамики, гломерулярной фильтрации, канальцевого транспорта натрия (ингибирует реабсорбцию натрия и увеличивает его экскрецию) [1]. Образование NO в организме катализируется NO-синтазой (NOS). Выявлены и охарактеризованы две конститутивные изоформы фермента (нейрональная NOS1, имеющая несколько сплайс-вариантов, и эндотелиальная NOS3) и одна индуцибельная изоформа (NOS2) [2, 3]. В почке представлены NOS1 α -, NOS1 β - и NOS3-изоформы [4]. При этом показано, что NOS1 β является основной изоформой NOS1 в клетках плотного пятна (*macula densa*) [4]. Основные доказательства роли NO в регуляции функций почек получены в исследованиях на животных с использованием доноров NO или NOS-ингибиторов [5–7]. Учитывая отсутствие изоформ-специфичных NOS-ингибиторов, более перспективным направлением для изучения роли NO и отдельных NO-синтаз для регуляции физиологических процессов в почке является нокаут генов, кодирующих NOS [2]. Выведены мыши с тройным нокаутом генов NOS (*n/i/eNOS KO* мыши), у них чрезвычайно низки концентрация метаболитов NO в плазме крови и их экскреция с мочой (приблизительно 3% нормальных значений). У мышей *n/i/eNOS KO* с возрастом развивается артериальная гипертензия, гипертриглицеридемия, системный атеросклероз и абдоминальное ожирение, наблюдается нарушение толерантности к глюкозе и выраженная инсулинорезистентность, а также встречается нефрогенный несахарный диабет [8]. Показано, что изолированный нокаут генов *nos1* и *nos3* может способствовать росту артериального давления [2, 9]. Продемонстрирована роль NOS1 β в плотном пятне в регуляции канальцево-клубочковой обратной связи и значимость NOS1 для регуляции активности Na/H-обменника (NHE3) в проксимальных канальцах и эпителиальных натриевых каналов (ENaC) в собирательных трубках в почках [10–13]. Мыши с полным нокаутом гена *nos1 α* являются нормотензивными даже на высокосолевого диеты [2]. У мышей с нокаутом гена *nos1* в *macula densa* (MD-NOS1 KO) [11] и *nos1* в собирательных трубках (CD-NOS1 KO) [12, 13] выявлено развитие соль-чувствительной гипертензии и нарушение натрийуретического ответа на поступление хлорида натрия. У CD-NOS1 KO мышей не происходит адекватного снижения альдостерона в ответ на высокосолевого диеты, но у них нет выраженных нарушений механизма концентрирования мочи и изменения потребления воды [14]. У мышей с нокаутом гена *nos1* во всех клетках тела [10] отмечено снижение всасывания бикарбоната в проксимальном канальце и тенденция к развитию метаболического ацидоза. Менее изучена роль NOS3 в регуляции транспорта солей в почке. У мышей NOS3-нокаутов описаны тенденция к росту артериального давления и развитие артериальной гипертензии при содержании на высокосолевого диеты [15]. При стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете у мышей NOS3 KO ускоряется прогрессирование диабетической нефропатии [16], менее эффективно действуют ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента и выше уровень альдостерона [17]. При нефрон-специфическом нокауте гена *nos3* у мышей (линия NS-NOS3 KO) развивается гипертензия (средние значения артериального давления на 20–30 мм рт. ст. выше, чем значения, наблюдаемые у животных дикого типа), при хронической солевой нагрузке нарушается выведение солей и в почке снижены общая и фосфорилированная формы Na/K/2Cl-котранспортера (NKCC2) [18].

Цель исследования – оценка ионорегулирующей функции почек у мышей с нокаутом гена *nos3* во всех клетках организма. В задачи исследования входило выведение мышей с нокаутом *nos3* (NOS3 KO), изучение у них экскреции ионов натрия и калия почками при поении водой, при нагрузке хлоридом натрия, а также оценка интенсивности транспорта натрия в толстом восходящем отделе петли Генле (тест на чувствительность к петлевому диуретику) у мышей NOS3 KO.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение линии мышей с нокаутом гена *nos3*

Мыши дикого типа линии C57Bl/6 и линии CD1 были получены из Центра коллективного пользования Института физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН) (FFSN-2021-0005).

Конструкции направляющей CRISPR РНК (sgРНК) для гена *nos3* были созданы с использованием стандартных методов молекулярной биологии и биоинформатики. Последовательности направляющих sgРНК для нокаутирования гена *nos3* подбирали с помощью программы Chopchop (<https://chopchop.cbu.uib.no>). Подбор праймеров для проведения ПЦР и секвенирования выполнялся с использованием программы PerlPrimer (<http://perlprimer.sourceforge.net/>). Синтез праймеров осуществляли в компании “ООО Бигль”, Россия. Все последовательности ДНК, полученные с помощью ПЦР, были секвенированы в ресурсном центре “Развитие молекулярных и клеточных технологий” (РЦ РМиКТ) Санкт-Петербургского государственного университета. Для наработки sgРНК к гену *nos3* в качестве матрицы использовали синтетическую последовательность ДНК, полученную после отжига частично комплементарных праймеров и последующего синтеза с помощью ДНК-полимеразы Taq («ООО Бигль»). Прямой праймер содержал промоторную последовательность для РНК-полимеразы бактериофага Т7, направляющую последовательность к выбранной области ДНК-мишени и фрагмент консервативной последовательности sgРНК, а обратный праймер содержал консервативную последовательность sgРНК. Праймеры приведены в табл. 1. Транскрипцию *in vitro* проводили с использованием Т7 РНК полимеразы (Invitrogen, США) в течение 1.5 ч при 37 °С. Для удаления ДНК-матрицы добавляли 2 мкл (2 ед.) ДНКазы I (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали при 37 °С в течение 15 мин. ДНКазу I инактивировали нагреванием при 65 °С в течение 10 мин. Выделение и очистку РНК проводили с помощью набора MEGAclean™ Transcription Clean-Up (Fermentas, США).

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Олигонуклеотид	Последовательность	Назначение праймера
sgRNA Nos3 for	gaaattaatacactagctatggctggggccgggttagcggggtttta gagctagaaatagc	Получение направляющей РНК
sgRNA Cas9 rev	aaaagcaccgactcgggtgccactttttcaagttgataacggactagcct tattttaacttgctatttctagctctaaaac	
Nos3GTPCR For	gcttgaccaatagctgctc	Аmplification фрагмента гена <i>nos3</i>
Nos3GTPCR Rev	accactctccactcaatcg	
Nos3 seq for	agggccaaatgtgaacaaag	Секвенирование

Для выведения мышей с нокаутом гена *nos3* на первом этапе вымывали оплодотворенные яйцеклетки мышей по стандартной методике [19]. Для этого половозрелым самкам мышей C57Bl/6 в возрасте 4–5 недель вводили 7.5 единиц гонадотропина сывотки жеребых кобыл и через 46 ч 7.5 единиц хорионического гонадотропина человека (ХГч). Самку сразу после введения ХГч подсаживали к содержавшемуся в отдельной клетке самцу той же линии (возраст от 6 до 14 месяцев). Вымывание зигот из самок-доноров с использованием культуральной среды Ооклин (ООО “ПанЭко”, Россия) делали через 11–12 ч после спаривания с самцами. Микроинъекции в цитоплазму зиготы (согласно процедуре [20]) смеси sgРНК к гену *nos3* и белка Cas9 проводили

с использованием микроинъектора FemtoJet и микроманипуляторов TransferMan 4R (Erppendorf, Германия), микроскопа Nikon (Япония) с оптической системой Nikon DIC (дифференциальный интерференционный контраст).

Подготовка псевдобеременных самок осуществлялась в соответствии с протоколом [21]. В качестве самок-реципиентов была выбрана аутбредная линия CD1. Все микрохирургические вмешательства выполнялись под общей анестезией с применением внутривенных инъекций смеси 30 мг/г золетила (Золетил 100, “Вирбак”, Франция) и 6 мг/г ксилазина (Ксила, “Интерхеми”, Нидерланды или Рометар, “Биовета”, Чехия). Вазэктомированных самцов линии CD1 в возрасте 3 месяцев получали с помощью микрохирургической операции согласно протоколу [22]. Для получения псевдобеременных самок их ссаживали с вазэктомированными самцами. На следующее утро после спаривания отбирали самок с копулятивными пробками. Оплодотворенные яйцеклетки после микроинъекций генетических конструкций подсаживали в яйцевод псевдобеременных самок линии CD1 с помощью микрохирургических операций. Рожденные в результате этого эксперимента детеныши (поколение F0) были генотипированы с помощью ПЦР и секвенированы. Геномную ДНК из образцов ткани мышей выделяли методом щелочного лизиса согласно протоколу [23] и анализировали с помощью ПЦР с праймерами, перечисленными в табл. 1. Анализ хроматограмм секвенирования проводили с использованием компьютерной программы Synthego (<https://www.synthego.com>). Далее на основании секвенирования ДНК целевого фрагмента ДНК детенышей F0 мышей выбирали мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания.

Выведение линейных гетерозиготных мышей из поколения F0 осуществляли путем их скрещивания с мышами C57Bl/6 дикого типа. Затем гетерозиготы скрещивали для получения гомозигот. Далее для избавления от потенциальных нецелевых мутаций проводили 6 обратных скрещиваний гомозигот с мышами C57Bl/6 дикого типа. Каждое обратное скрещивание включало в себя последовательное скрещивание гомозиготных мышей с мышами C57Bl/6 дикого типа и последующее скрещивание полученных гетерозигот между собой для получения гомозигот.

Проведение физиологических экспериментов

В физиологической части исследования было использовано 39 половозрелых мышей: 10 самок и 10 самцов линии C57Bl/6, 10 самок и 9 самцов линии NOS KO. Генотип мышей NOS KO был подтвержден в возрасте 4 недель классическим способом с помощью ПЦР и секвенирования. В каждую экспериментальную группу включено по 9-10 животных, что потенциально достаточно для выявления 30% различий в исследуемых параметрах (величина эффекта $d = 1.4$) при мощности критериев 0.80 и уровне значимости 0.05. Для наблюдения и проведения физиологических экспериментов мышей в возрасте с 2 до 9 месяцев содержали в виварии ЦКП Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Животные размещались в клетках по 1-4 особи. Для поддержания стабильных условий окружающей среды клетки находились в системе содержания животных Norgit A-Box 120 (Франция): искусственное освещение 12/12 ч (07.00-19.00 – день при искусственном освещении лампами дневного света, 19.00-07.00 – ночь), температура воздуха 22-25 °C, относительная влажность 50-60%, НЕРА-фильтрация воздуха, контроль частоты воздухообмена (до 35 объемов в ч). Мыши имели свободный доступ к питьевой воде и корму для содержания лабораторных животных ЛБК-120 производства ЗАО “Тосненский комбикормовый завод” (Россия).

Все эксперименты проводили у животных натощак (корм забирали за 16 ч до эксперимента). Дозы препаратов и параметры функции почек нормировали на 1 г массы тела животных. Серии экспериментов: контроль с введением воды в объеме 10 мл/г для увеличения мочеотделения; нагрузочная проба NaCl (7.7 ммоль/г в виде 5%-ного раствора NaCl перорально, объем 9 мл/г); введение фуросемида (ОАО “Дальхимфарм”,

Россия) 5 мг/г внутрибрюшинно. Воду и раствор NaCl вводили в желудок с помощью тонкого металлического зонда с шариком на конце. Целью использования нагрузочной пробы с NaCl было создание достаточного избытка натрия в организме. У грызунов для этих целей используется однократное введение NaCl до 75% от его содержания в организме; нами ранее была отработана методика с введением 40% избытка NaCl от его содержания в организме у крыс (0.45 г/кг, или 7.7 ммоль/кг). Такая нагрузочная проба у крыс вызывает диуретический ответ почек через 30 мин, пик диуретической и натрийуретической реакции наблюдается через 1 ч от начала эксперимента, и за 2 ч выводится около 40% введенного NaCl [24].

Для сбора проб мочи при произвольных мочеиспусканиях в течение 3 ч после воздействия или в контрольных условиях мышей помещали в индивидуальные клетки с проволочным дном и пластиковыми пробирками типа Эппендорф. Собранные пробы мочи хранили в холодильнике при 4–8 °С. По окончании каждого опыта мышей возвращали в клетки вивария, интервал между экспериментами составлял не менее двух недель.

В пробах мочи определяли концентрацию натрия и калия методом пламенной фотометрии (двухканальный фотометр Sherwood-420, Великобритания) и концентрацию креатинина кинетическим методом по реакции Яффе (автоматический анализатор Erba XL-200, Чехия). Рассчитывали суммарный диурез, экскрецию креатинина, выведение ионов натрия и калия почками за 2 ч (соответствует длительности ответа почек на нагрузочные пробы и диуретик), как описано ранее [25].

Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism 8.0. Нормальность распределения оценивали по тесту Шапиро–Уилка и с помощью построения квантиль-квантиль графиков. Из всех показателей только экскреция ионов калия после нагрузочной пробы с NaCl не соответствовала нормальному распределению, но, учитывая небольшое число наблюдений, в основном использовали методы непараметрической статистики. На диаграммах разброса, кроме индивидуальных значений, и в тексте приведены медианы и межквартильные размахи (Me, Q1 – Q3), на графике динамики представлены средние значения и стандартные ошибки среднего ($M \pm SE$). Для сравнения групп использовали критерий Краскела–Уоллиса, при *post hoc* анализе – критерий Данна. Различия рассматривались как статистически значимые при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У выведенной нами линии мышей полностью отсутствует фермент NOS3, так как полученная делеция со сдвигом рамки считывания находится в начале второго экзона (рис. 1).

На протяжении всего периода наблюдения мыши NOS KO имели меньшую массу тела по сравнению с мышами дикого типа (C57Bl/6) (рис. 2); по длине тела животных (рис. 2) значимых различий не выявлено. Самцы обеих линий мышей были крупнее, чем самки.

У мышей с нокаутом гена *nos3* была сохранна азотовыделительная функция почек, экскреция у них креатинина составила 15.0 (14.5–16.0) мкмоль/мин/г у самок и 18.0 (16.5–20.1) мкмоль/мин/г у самцов, а у мышей дикого типа – 13.7 (10.2–14.2) и 19.8 (16.2–23.0) мкмоль/мин/г соответственно ($p > 0.05$). Не выявлено межлинейных различий в экскреции ионов натрия (рис. 3а) и калия (рис. 3б) у мышей после введения им воды (10 мкл/г). Диурез составил 13.0 (7.1–16.1) мкл/г/2 ч у мышей дикого типа и 7.0 (4.7–11.2) мкл/г/2 ч у мышей NOS KO. Выведение ионов натрия было на достаточно низком уровне, экскреция калия по величине превышала выведение натрия. Экскреция ионов калия была выше у самцов по сравнению с самками у обеих линий мышей (рис. 3б), половые различия в экскреции ионов натрия наблюдались только у мышей C57Bl/6 (рис. 3а).

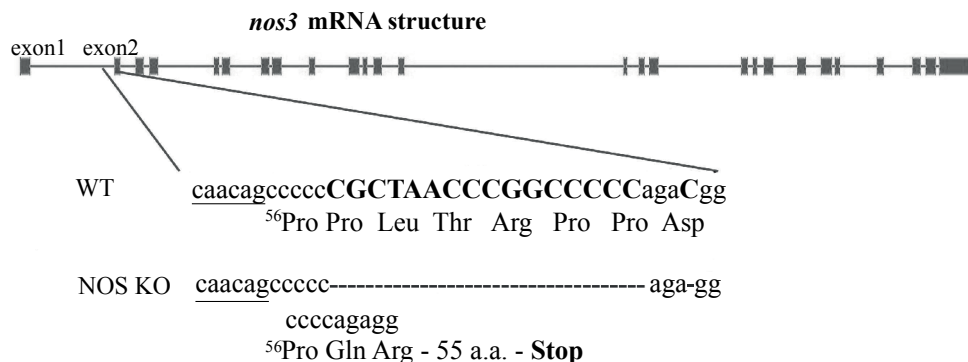


Рис. 1. Схема делеции в гене *nos3*. Подчеркнута последовательность интрона, более крупным и жирным шрифтом выделена последовательность, делетированная у мышей NOS KO.

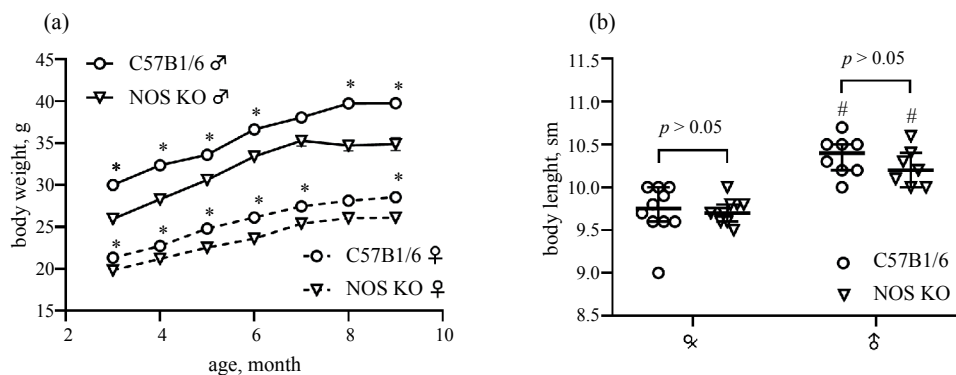


Рис. 2. Соматометрические показатели самцов (♂) и самок (♀) мышей NOS KO и дикого типа (C57B1/6). (a) – Масса тела мышей в возрасте от 3 до 9 месяцев. (b) – Длина тела мышей в возрасте 9 месяцев. Значимость различий ($p < 0.05$): * – при сравнении мышей двух линий, # – при сравнении самок и самцов.

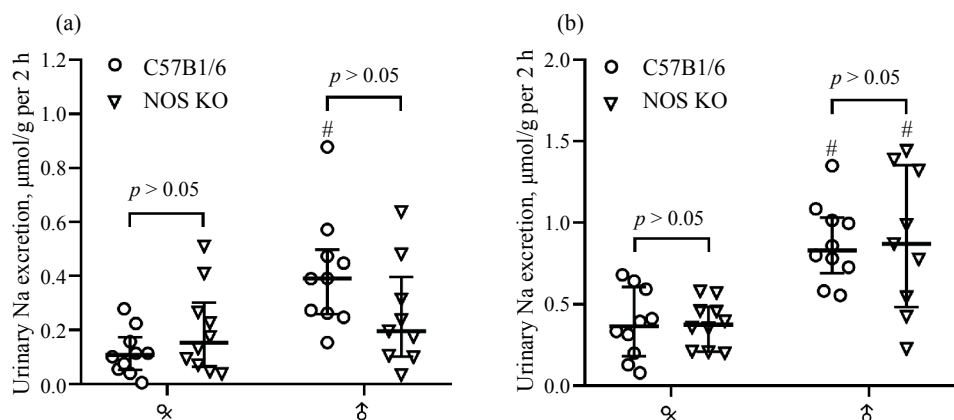


Рис. 3. Экскреция ионов натрия (a) и калия (b) почками за 2 ч у самцов (♂) и самок (♀) мышей NOS KO и дикого типа (C57B1/6) после введения воды в объеме 10 мл/г. Значимость различий ($p < 0.05$): # – при сравнении самок и самцов.

Использование нагрузочной пробы с введением NaCl не выявило различий в ответе почек на избыточное поступление натрия в организм у мышей с нокаутом гена эндотелиальной NO-синтазы и контрольных животных (рис. 4). Введение 9 мкл/г 5%-ного раствора NaCl перорально приводило к значительному росту экскреции натрия как у мышей NOS KO, так и у мышей C57Bl/6 (по сравнению с контрольной группой выше в 15–30 раз у самок и в 2–7 раз у самцов). Диурез не превышал таковой в контрольной группе, он составил 5.4 (2.2–9.3) мкл/г/2 ч у мышей дикого типа и 4.6 (3.2–9.2) мкл/г/2 ч у мышей NOS KO.

Обнаружено, что натрийурез у мышей обеих линий был статистически значимо выше у самок по сравнению с самцами (рис. 4а). В ответ на нагрузочную пробу NaCl несколько возросла экскреция ионов калия почками у самок крыс обеих линий – в 2.1 раза у мышей NOS KO, в 3.5 раза у мышей C57Bl/6 (рис. 3b и 4b).

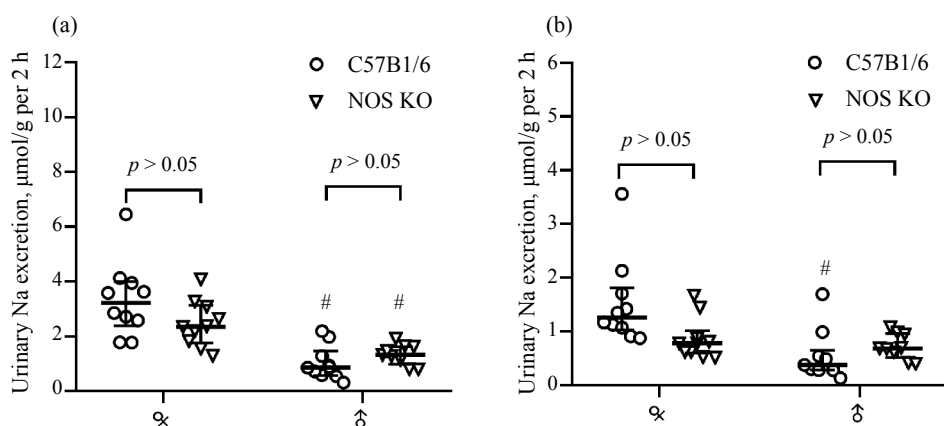


Рис. 4. Экскреция ионов натрия (а) и калия (б) почками за 2 ч у самцов (♂) и самок (♀) мышей NOS KO и дикого типа (C57Bl/6) после нагрузочной пробы NaCl (7.7 мкмоль/г). Значимость различий ($p < 0.05$): # – при сравнении самок и самцов.

Проведены эксперименты с оценкой чувствительности мышей NOS KO к петлевому диуретику фуросемиду для выявления потенциальных отличий в транспорте натрия и калия в почках при нарушении синтеза NO. Диуретический и натрийуретический эффекты (рис. 5а) фуросемида у мышей NOS KO были выражены сильнее, чем у мышей дикого типа. Диурез после введения фуросемида составил 35.5 (29.2–40.1) мкл/г/2 ч у мышей NOS KO и 21.3 (17.2–28.4) мкл/г/2 ч у мышей C57Bl/6 ($p = 0.0001$). Экскреция ионов калия после введения фуросемида во всех группах животных не различалась (рис. 5b). Половых различий в чувствительности почек к фуросемиду у мышей NOS KO и C57Bl/6 не выявлено.

Показано, что длительность действия фуросемида у животных обеих линий одинакова и составляет около 90 мин. При этом пик натрийуреза, который наблюдался через 15–30 мин после введения диуретика, был значимо выше у мышей NOS KO (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашем исследовании были выявлены различия в экскреции ионов натрия и калия у самцов и самок мышей C57Bl/6 (вне зависимости от нокаута гена *nos3*) как при стандартном поступлении NaCl с пищей, так и после введения животным острой солевой

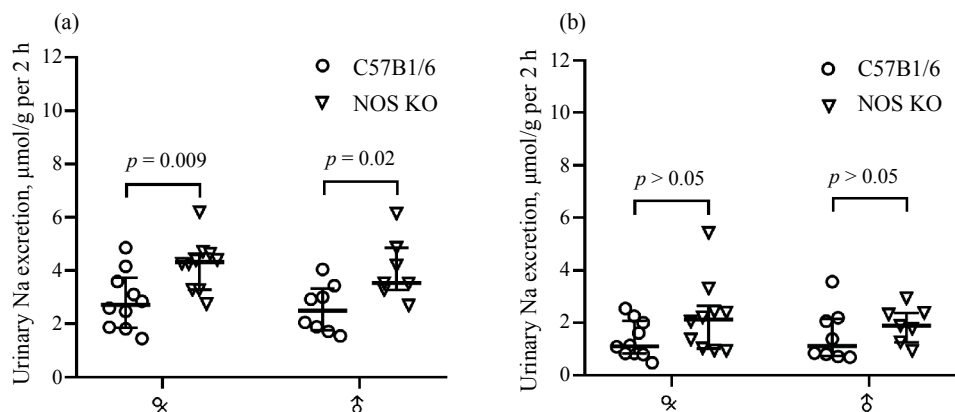


Рис. 5. Экскреция ионов натрия (а) и калия (б) почками за 2 ч у самцов (♂) и самок (♀) мышей NOS KO и дикого типа (C57B1/6) после инъекции 5 мкг/г фуросемида.

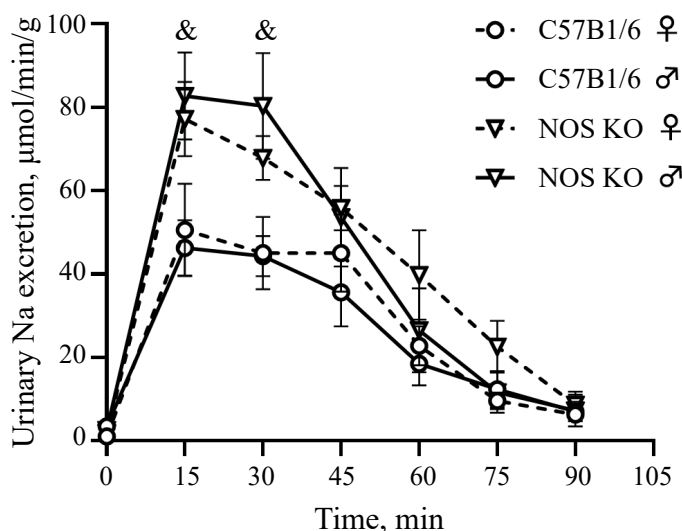


Рис. 6. Динамика экскреции ионов натрия почками у самцов (♂) и самок (♀) мышей NOS KO и дикого типа (C57B1/6) после инъекции 5 мкг/г фуросемида. Значимость различий ($p < 0.05$): & – при межгрупповых сравнениях в отдельных временных точках. Базальный натрийурез (0 мин) оценивался по собранным в утренний период пробам мочи у животных без воздействия.

нагрузки. Экскреция натрия (оцененная при умеренном водном диурезе) была выше у самцов, чем у самок, а ответ на нагрузочную пробу с NaCl был сильнее у самок. Подобные различия в натрийуретической реакции почки в ответ на острую перегрузку NaCl описаны для крыс [26]. Показано, что этот феномен является следствием различий в экспрессии рецепторов гормонов (например, к ангиотензину) и транспортеров в нефроне, действии половых гормонов, пролактина и др. [27]. Наиболее выраженные различия выявлены для транспортеров в проксимальном отделе нефрона. В опытах на крысах показано, что после введения избытка соли у самок в 2 раза эффективнее снижается реабсорбция натрия в проксимальном канальце нефрона, чем у самцов. Для

мышей линии C57Bl/6 были выявлены схожие различия в экспрессии и фосфорилировании различных транспортеров в нефроне между самцами и самками.

NOS3 функционирует как в канальцевых клетках, так и в клетках эндотелия почечных сосудов. Представляет интерес факт различий, полученных в нашей работе на тотальных NOS3 нокаутах, и ранее опубликованных данных, полученных на мышах с нефрон-специфическим NOS3 нокаутом (NS-NOS3 KO) [18]. Обе линии мышей NOS3 KO и NS-NOS3 KO выведены на основе линии C57Bl/6. Для NS-NOS3 KO мышей было показано замедление выведения избытка натрия (NaCl 7.7 мкмоль/г) после острой солевой нагрузки (1.5 мл/мышь 0.9%-ного раствора NaCl внутривентрально) по сравнению с мышами дикого типа; при содержании на высокосолевой диете у них был ниже уровень ренина и снижена экскреция натрия с мочой [18]. В нашей работе у NOS3 KO мышей реакция на острую солевую нагрузку (9 мкл/г 5%-ного раствора NaCl через зонд) не отличалась от таковой у мышей дикого типа. Различия могут быть связаны с разными экспериментальными подходами к моделированию положительного баланса натрия в организме (внутрибрюшинное или пероральное введение раствора NaCl, изотонический или гипертонический раствор NaCl), а также значимостью системной продукции NO, а не только нарушением работы NOS3 в нефроне.

Выявленные в данном исследовании отличия NOS3 KO мышей от мышей дикого типа по чувствительности к фуросемиду могут указывать на усиление реабсорбции натрия в толстом восходящем отделе петли Генле в условиях дефекта NOS3. В основе этого процесса может лежать повышение экспрессии NKCC2 в почке. Тест с определением чувствительности к фуросемиду является часто используемым подходом для физиологической оценки активности и представленности NKCC2 в почке. В работах на крысах линии Fischer 344 X Brown Norway (F1) при содержании на высокожировой диете [28] у мышей с соль-резистентной артериальной гипертензией, связанной с мутацией в пуриновых рецепторах P2Y2 [29], у крыс с циррозом, вызванным перевязкой общего желчного протока [30], у крыс линии Zucker с ожирением [31] показано, что усиленный натрийурез в ответ на инъекцию фуросемида ассоциирован с увеличением активности NKCC2 и/или увеличением экспрессии NKCC2 в толстом восходящем отделе петли Генле, что было подтверждено методом иммуноблоттинга. Выявленная в нашей работе повышенная чувствительность к фуросемиду также может свидетельствовать о повышении экспрессии NKCC2 в почке, что требует отдельной экспериментальной проверки. Известно, что оксид азота ингибирует NKCC2 в почке и снижает его экспрессию. В условиях дефекта NOS3 снижение продукции оксида азота может лежать в основе повышения активности NKCC2 [32]. В исследовании на мышах с NOS3 нокаутом было показано, что при переносе генетической конструкции, содержащей ген *nos3*, в клетки толстого восходящего отдела петли Генле восстанавливается индуцируемая L-аргинином продукция оксида азота NO и ингибируется транспорт NaCl [33]. Важным является ответ на вопрос о патогенезе изменений, лежащих в основе повышения чувствительности почек к действию фуросемида. Это может быть как следствием изменения активности NOS3 в самих канальцевых клетках или в других структурах почек, так и реакций почек на какие-то системные, например, гемодинамические изменения [16–18] или обменные нарушения [16, 34] в организме, связанные с выключением NOS3. Свидетельством метаболических нарушений у животных при нокауте гена *nos3* может являться более низкая масса тела у мышей NOS KO, чем у C57Bl/6. Интересно, что в отличие от наших данных, полученных на мышах NOS3 KO, у мышей NS-NOS3 KO [18] чувствительность к фуросемиду была такой же, как и у мышей дикого типа. Возможно, продукция оксида азота эндотелиальными клетками у мышей NS-NOS3 KO нивелирует влияние дефицита NO на NKCC2 в толстом восходящем отделе петли Генле, чего не происходит при тотальном нокауте NOS3.

Таким образом, в представленной работе впервые выявлено повышение чувствительности к фуросемиду у мышей с полным нокаутом гена *nos3*, что может указывать

на значимость NO и активности NOS3 для регуляции транспорта натрия в толстом восходящем отделе петли Генле. Патогенез выявленного явления нуждается в дальнейшем экспериментальном изучении.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (К. А. В., Л. Е. И.), сбор данных (С. Ю. В., Ч. А. В., Б. Г. В., Б. Е. В., К. А. В.), обработка данных (Б. Е. В., К. А. В.), написание и редактирование манускрипта (К. А. В., Б. Г. В., Б. Е. В., С. Ю. В., Ч. А. В., Л. Е. И.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Санкт-Петербургского государственного университета (проект ID 129658320) и государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (№ 075-00263-25-00) на базе ЦКП Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Секвенирование проводилось в РЦ РМИКТ Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и одобрены Этическим комитетом в области исследований на животных Санкт-Петербургского государственного университета (разрешение № 131-03-5 от 11.10.2022 г.) и Комиссией по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол № 2-2/2024 заседания № 2 от 29.02.2024 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Elmarakby AA, Saad KM, Crislip GR, Sullivan JC* (2023) Acute nitric oxide synthase inhibition induces greater increases in blood pressure in female versus male Wistar Kyoto rats. *Physiol Rep* 11(15): e15771. <https://doi.org/10.14814/phy2.15771>
2. *Huang PL* (2000) Mouse models of nitric oxide synthase deficiency. *J Am Soc Nephrol Suppl* 16: S120–S123. https://doi.org/10.1681/ASN.V11suppl_2s120
3. *Hosseini N, Kourosh-Armani M, Nadjafi S, Ashtari B* (2022) Structure, Distribution, Regulation, and Function of Splice Variant Isoforms of Nitric Oxide Synthase Family in the Nervous System. *Curr Protein Pept Sci* 23(8): 510–534. <https://doi.org/10.2174/1389203723666220823151326>
4. *Liu R, Juncos LA, Lu Y, Wei J, Zhang J, Wang L, Lai EY, Carlstrom M, Persson AEG* (2023) The Role of Macula Densa Nitric Oxide Synthase 1 Beta Splice Variant in Modulating Tubuloglomerular Feedback. *Compr Physiol* 13(1): 4215–4229. <https://doi.org/10.1002/cphy.c210043>
5. *Noonan WT, Banks RO* (1999) The role of nitric oxide in saline-induced natriuresis and diuresis in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 221(4): 376–381. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1373.1999.d01-95.x>
6. *Lage RC, Campagnole-Santos MJ, Fontes MA, Santos RA* (1999) Cardiovascular effects produced by nitric oxide-related drugs in the caudal ventrolateral medulla. *Neuroreport* 10(4): 731–735. <https://doi.org/10.1097/00001756-199903170-00013>

7. *Szentiványi M Jr, Park F, Maeda CY, Cowley AW Jr* (2000) Nitric oxide in the renal medulla protects from vasopressin-induced hypertension. *Hypertension* 35(3): 740–745.
<https://doi.org/10.1161/01.hyp.35.3.740>
8. *Tsutsui M, Shimokawa H, Morishita T, Nakashima Y, Yanagihara N* (2006) Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases. *J Pharmacol Sci* 102(2): 147–154.
<https://doi.org/10.1254/jphs.cpj06015x>
9. *Hyndman KA, Pollock JS* (2013) Nitric oxide and the A and B of endothelin of sodium homeostasis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 22(1): 26–31.
<https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32835b4edc>
10. *Wang T, Inglis FM, Kalb RG* (2000) Defective fluid and HCO₃(-)-absorption in proximal tubule of neuronal nitric oxide synthase-knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 279(3): F518–F524.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.279.3.F518>
11. *Lu Y, Wei J, Stec DE, Roman RJ, Ge Y, Cheng L, Liu EY, Zhang J, Hansen PB, Fan F, Juncos LA, Wang L, Pollock J, Huang PL, Fu Y, Wang S, Liu R* (2016) Macula Densa Nitric Oxide Synthase 1 β Protects against Salt-Sensitive Hypertension. *J Am Soc Nephrol* 27(8): 2346–2356.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2015050515>
12. *Hyndman KA, Boesen EI, Elmarakby AA, Brands MW, Huang P, Kohan DE, Pollock DM, Pollock JS* (2013) Renal collecting duct NOS1 maintains fluid-electrolyte homeostasis and blood pressure. *Hypertension* 62(1): 91–98.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01291>
13. *Hyndman KA, Mironova EV, Giani JF, Dugas C, Collins J, McDonough AA, Stockand JD, Pollock JS* (2017) Collecting Duct Nitric Oxide Synthase 1 β Activation Maintains Sodium Homeostasis During High Sodium Intake Through Suppression of Aldosterone and Renal Angiotensin II Pathways. *J Am Heart Assoc* 6(10): e006896.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006896>
14. *Mendoza LD, Hyndman KA* (2019) The contribution of collecting duct NOS1 to the concentrating mechanisms in male and female mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 317(3): F547–F559.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00180.2019>
15. *Kopkan L, Hess A, Husková Z, Cervenka L, Navar LG, Majid DS* (2010) High-salt intake enhances superoxide activity in eNOS knockout mice leading to the development of salt sensitivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 299(3): F656–F663.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00047.2010>
16. *Takahashi T, Harris RC* (2014) Role of endothelial nitric oxide synthase in diabetic nephropathy: Lessons from diabetic eNOS knockout mice. *J Diabetes Res* 2014: 590541.
<https://doi.org/10.1155/2014/590541>
17. *Kosugi T, Heinig M, Nakayama T, Matsuo S, Nakagawa T* (2010) eNOS knockout mice with advanced diabetic nephropathy have less benefit from renin-angiotensin blockade than from aldosterone receptor antagonists. *Am J Pathol* 176(2): 619–629.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090578>
18. *Gao Y, Stuart D, Takahishi T, Kohan DE* (2018) Nephron-Specific Disruption of Nitric Oxide Synthase 3 Causes Hypertension and Impaired Salt Excretion. *J Am Heart Assoc* 7(14): e009236.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.118.009236>
19. *Litscher ES, Wassarman PM* (2010) Isolation and manipulation of mouse gametes and embryos. *Methods Enzymol* 476: 73–84.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)76005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)76005-5)
20. *Doe B, Brown E, Boroviak K* (2018) Generating CRISPR/Cas9-Derived Mutant Mice by Zygote Cytoplasmic Injection Using an Automatic Microinjector. *Methods Protoc* 1(1): 5.
<https://doi.org/10.3390/mps1010005>
21. *Hasegawa A, Mochida K, Ogonuki N, Hirose M, Tomishima T, Inoue K, Ogura A* (2017) Efficient and scheduled production of pseudopregnant female mice for embryo transfer by estrous cycle synchronization. *J Reprod Dev* 63(6): 539–545.
<https://doi.org/10.1262/jrd.2017-068>
22. *Preece C, Alghadban S, Bouchareb A, Moralli D, Biggs D, Davies B* (2021) Replacement of surgical vasectomy through the use of wild-type sterile hybrids. *Lab Anim (NY)* 50(2): 49–52.
<https://doi.org/10.1038/s41684-020-00692-w>
23. *Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML* (2000) Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques* 29(1): 52–54.
<https://doi.org/10.2144/00291bm09>
24. *Kutina AV, Golosova DV, Marina AS, Shakhmatova EI, Natochin YV* (2016) Role of Vasopressin in the Regulation of Renal Sodium Excretion: Interaction with Glucagon-Like Peptide-1. *J Neuroendocrinol* 28(4).
<https://doi.org/10.1111/jne.12367>

25. Kutina AV, Marina AS, Shakhmatova EI, Natochin YV (2013) Physiological mechanisms for the increase in renal solute-free water clearance by a glucagon-like peptide-1 mimetic. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 40(8): 510–517.
<https://doi.org/10.1111/1440-1681.12119>
26. Veiras LC, Girardi ACC, Curry J, Pei L, Ralph DL, Tran A, Castelo-Branco RC, Pastor-Soler N, Arranz CT, Yu ASL, McDonough AA (2017) Sexual Dimorphic Pattern of Renal Transporters and Electrolyte Homeostasis. *J Am Soc Nephrol* 28(12): 3504–3517.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2017030295>
27. McDonough AA, Layton AT (2023) Sex differences in renal electrolyte transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 32(5): 467–475.
<https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000909>
28. Riazi S, Tiwari S, Sharma N, Rash A, Ecelbarger CM (2009) Abundance of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2 is increased by high-fat feeding in Fischer 344 X Brown Norway (F1) rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 296(4): F762–F770.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.90484.2008>
29. Rieg T, Bunday RA, Chen Y, Deschenes G, Junger W, Insel PA, Vallon V (2007) Mice lacking P2Y2 receptors have salt-resistant hypertension and facilitated renal Na⁺ and water reabsorption. *FASEB J* 21(13): 3717–3726.
<https://doi.org/10.1096/fj.07-8807com>
30. Jonassen TE, Brond L, Torp M, Graebe M, Nielsen S, Skott O, Marcussen N, Christensen S (2003) Effects of renal denervation on tubular sodium handling in rats with CBL-induced liver cirrhosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(3): F555–F563.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00258.2002>
31. Riazi S, Madala-Halagappa VK, Hu X, Ecelbarger CA (2006) Sex and body-type interactions in the regulation of renal sodium transporter levels, urinary excretion, and activity in lean and obese Zucker rats. *Genet Med* 3(4): 309–327.
[https://doi.org/10.1016/s1550-8579\(06\)80219-6](https://doi.org/10.1016/s1550-8579(06)80219-6)
32. Ramseyer VD, Ortiz PA, Carretero OA, Garvin JL (2016) Angiotensin II-mediated hypertension impairs nitric oxide-induced NKCC2 inhibition in thick ascending limbs. *Am J Physiol Renal Physiol* 310(8): F748–F754.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00473.2015>
33. Ortiz PA, Hong NJ, Wang D, Garvin JL (2003) Gene transfer of eNOS to the thick ascending limb of eNOS-KO mice restores the effects of L-arginine on NaCl absorption. *Hypertension* 42(4): 674–679.
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000085561.00001.81>
34. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: The role of endogenous nitric oxide. *Science* 299(5608): 896–899.
<https://doi.org/10.1126/science.1079368>

***Nos3* Gene Knockout in Mice Enhances Kidney Sensitivity to Furosemide**

**A. V. Kutina^{a, b, *}, G. V. Belyakov^{a, b}, E. V. Balbotkina^a, A. V. Chirinskaite^b,
J. V. Sopova^b, and E. I. Leonova^b**

*^aSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, Russia*

*^bCenter for Transgenesis and Genome Editing at Saint-Petersburg State University, St. Petersburg,
Russia*

**e-mail: kutina_anna@mail.ru*

Nitric oxide (NO) regulates renal hemodynamics and inhibits tubular sodium reabsorption. NO formation is catalyzed by NO synthases (NOS), and it is important to study the role of individual NO synthases for renal functions. The purpose of the study was to obtain a line of mice with a knockout of the *nos3* gene (NOS KO) and to evaluate their ion-regulatory renal function. A homozygous line of NOS KO mice was developed at the background of the C57Bl/6 line using the CRISPR-Cas9 editing method. The physiological study included 39 animals (10 female and 10 male C57Bl/6 mice; 10 female and 9 male NOS KO mice); genotyping was carried out using PCR and sequencing methods at the age of 4 weeks. To identify differences in the transport of sodium and potassium in the kidneys of NOS KO mice, experiments were conducted to assess ion excretion in animals when given water (control), with a NaCl load (7.7 $\mu\text{mol/g}$) and with the administration of a loop diuretic. In the control, no differences were detected in the excretion of sodium and potassium ions in NOS KO and C57Bl/6 mice. Under conditions of excess NaCl intake, no significant interstrain differences were also revealed: sodium and potassium excretion increased by 8.8 and 1.3 times in NOS KO mice and by 8.4 and 1.7 times in wild-type mice, respectively. The natriuretic effect of furosemide (5 $\mu\text{g/g}$) in NOS KO mice was greater than in C57Bl/6 mice. Urinary sodium excretion was 4.1 ± 0.3 $\mu\text{mol/g}$ during 2 hours of observation in NOS KO and 2.7 ± 0.2 $\mu\text{mol/g}$ in wild-type mice ($p < 0.001$). Thus, the work revealed for the first time an increase in sensitivity to furosemide in mice with a knockout of the *nos3* gene, which may indicate the importance of the activity of endothelial NO synthase for the regulation of sodium transport in the thick ascending limb of the loop of Henle.

Keywords: endothelial NO synthase, *nos3* gene knockout, mouse, natriuresis, furosemide, kidney, ion excretion