

DOI: 10.7868/S2658655X26020021
УДК 612.46:612.015.32:612.35-092.9

Экспериментальная статья

Гипогликемия натошак и сохраненная функция почек у мышей с нокаутом эндотелиальной NO-синтазы

А.В. Кутина^{1,2,*}, Г.В. Беляков¹, Е.В. Балботкина¹, П.А. Вишнякова³,
А.М. Косырева³, А.В. Чиринскайте², Ю.В. Сопова², Е.И. Леонова²

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация*

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

³*Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы,
Москва, Российская Федерация*

*E-mail: kutina_anna@mail.ru

Аннотация. Оксид азота (NO) – важная сигнальная молекула, регулирующая многочисленные физиологические процессы. Нарушение продукции NO и инактивация генов различных изоформ эндотелиальной NO-синтазы наиболее часто затрагивают такие органы-мишени, как почки и печень. Целью настоящей работы стало исследование морфологии почек и печени, ионорегулирующей функции почек и гликемии у взрослых мышей с нокаутом гена *nos3*. Линия гомозиготных мышей NOS3 KO была получена на основе линии C57Bl/6 с использованием технологии редактирования генома CRISPR-CAS. У самок и самцов мышей NOS3 KO и дикого типа в возрасте 3–7 месяцев исследовали уровень гликемии и/или экскрецию натрия с мочой при свободном доступе к пище, после 17-часового голодания и после теста солевой нагрузки. В возрасте 9-ти месяцев животных выводили из эксперимента, почки и печень фиксировали в нейтральном формалине, после чего выполняли стандартную гистологическую обработку и окрашивание. При свободном доступе к пище, натошак и в тесте с солевой нагрузкой экскреция натрия и соотношение натрий/креатинин не различались у мышей NOS3 KO и дикого типа. У мышей NOS3 KO сохранялась кортико-медуллярная структура почек, патологических изменений не выявлено. У самцов NOS3 KO обнаружены снижение запасов гликогена в печени и выраженное падение уровня глюкозы в крови в условиях голодания. Фармакологическая коррекция уровня NO введением донора NO (изосорбида динитрат) привела к повышению уровня глюкозы в крови у самцов NOS3 KO. Таким образом, в исследовании показано, что мыши с нокаутом эндотелиальной NO-синтазы сохраняют нормальную структуру и функцию почек. У самцов NOS3 KO выявлена тенденция к развитию гипогликемии натошак и снижению

количества гликогена в гепатоцитах, что указывает на участие эндотелиальной NO-синтазы в регуляции углеводного обмена.

Ключевые слова: почка, мышцы с нокаутом эндотелиальной NO-синтазы, натрийурез, гликемия, печень, гликоген

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Санкт-Петербургского государственного университета (СПбГУ, проект: ID 129658320) и государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии РАН (№ 075-00263-25-00).

Соблюдение этических стандартов. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, и принципам Базельской декларации. Протоколы экспериментов были одобрены Этическим комитетом Санкт-Петербургского государственного университета (разрешение № 131-03-5 от 10.11.2022 г.) и Комитетом по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол № 2-2/2024, заседание № 2 от 29.02.2024 г.).

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

Вклад авторов в публикацию. АВК, ЕИЛ – концепция исследования; АВК, ГВБ, ЕВБ, ПАВ, АМК, АВЧ, ЮВС – методология и проведение исследования; АВК, ГВБ – обработка данных; АВК – подготовка первоначального варианта рукописи; ГВБ, ЕВБ, ПАВ, АМК, АВЧ, ЮВС – редактирование; ЕИЛ – финансирование; АВК, ЕИЛ – ресурсы; ЕИЛ – научное руководство.

Благодарности. Работа выполнена на базе Центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН; секвенирование проведено в Ресурсном центре молекулярных и клеточных технологий Санкт-Петербургского государственного университета.

Ссылка для цитирования: Кутина А.В., Беляков Г.В., Балботкина Е.В., Вишнякова П.А., Косырева А.М., Чиринскайте А.В., Сопова Ю.В., Леонова Е.И. Гипогликемия натощак и сохраненная функция почек у мышей с нокаутом эндотелиальной NO-синтазы. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова / Russian Journal of Physiology.* 2026. Т. 112. № 2. С. 429–446. <https://doi.org/10.7868/S2658655X26020021>

Fasting Hypoglycemia and Preserved Renal Function in Endothelial NO Synthase Knockout Mice

A.V. Kutina^{1,2,*}, G.V. Belyakov¹, E.V. Balbotkina¹, P.A. Vishnyakova³,
A.M. Kosyreva³, A.V. Chirinskaite², Yu.V. Sopova², E.I. Leonova²

¹*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, Russian Federation*

²*Center for Transgenesis and Genome Editing, Saint-Petersburg State University,
St. Petersburg, Russian Federation*

³*Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba,
Moscow, Russian Federation*

*E-mail: kutina_anna@mail.ru

Abstract. Nitric oxide (NO) is an important signaling molecule that regulates numerous physiological processes. Impairment of nitric oxide production and inactivation of genes encoding various NOS isoforms most commonly affect such target organs as the kidneys and liver. The aim of the present study was to investigate kidney and liver morphology, renal ion-regulating function, and glycemia in adult mice with *nos3* gene knockout (NOS3 KO). A line of homozygous NOS3 KO mice was generated on a C57Bl/6 background using CRISPR-Cas9 genome editing technology. In NOS3 KO and wild-type mice aged 3–7 months, glycemia levels and/or urinary sodium excretion were assessed under conditions of free access to food, after a 17-hour fast, and following a salt loading test. At the age of 9 months, the animals were euthanized; kidneys and liver were fixed in neutral formalin, followed by standard histological processing and staining. Under conditions of free access to food, fasting, and in the salt loading test, sodium excretion and the sodium/creatinine ratio did not differ between NOS3 KO and wild-type mice. NOS3 KO mice maintained the corticomedullary structure of the kidneys, and no pathological changes were detected. Male NOS3 KO mice exhibited reduced liver glycogen stores and a pronounced decrease in blood glucose levels under fasting conditions. Pharmacological correction of nitric oxide levels by administration of an NO donor (isosorbide dinitrate) led to an increase in blood glucose levels in male NOS3 KO mice. Thus, the study demonstrates that mice with an endothelial NO synthase gene knockout maintain normal kidney structure and function. Male NOS3 KO mice showed a tendency to develop fasting hypoglycemia and a reduced glycogen content in hepatocytes, indicating the involvement of NOS3 in the regulation of carbohydrate metabolism.

Keywords: kidney, endothelial nitric oxide synthase knockout mice, natriuresis, glycemia, liver, glycogen

Funding. The study was supported by the St. Petersburg State University (SPb-SU, project ID 129658320) and the state assignment of the Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences (No. 075-00263-25-00).

Ethics declarations. All procedures performed in animal studies complied with the ethical standards approved by the legal acts of the Russian Federation and the principles of the Basel Declaration. The experimental protocols were approved by the Ethics Committee of St. Petersburg State University (approval No. 131-03-5 dated November 10, 2022) and the Bioethics Committee of the Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences (protocol No. 2-2/2024, meeting No. 2 dated February 29, 2024).

Conflict of interest. The authors declare that there are no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Authors contribution. AVK, EIL – research concept; AVK, GVB, EVB, PAV, AMK, AVCh, YuVS – research methodology and conduct; AVK, GVB – data processing; AVK – initial manuscript preparation; GVB, EVB, PAV, AMK, AVCh, YuVS – editing; EIL – funding; AVK, EIL – resources; EIL – scientific supervision.

Acknowledgements. The work was carried out at the Center for Shape Use of the Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences; sequencing was performed at the Resource Center for Molecular and Cellular Technologies at St. Petersburg State University.

For Citation: Kutina A.V., Belyakov G.V., Balbotkina E.V., Vishnyakova P.A., Kosyreva A.M., Chirinskaite A.V., Sopova Yu.V., Leonova E.I. Fasting hypoglycemia and preserved renal function in endothelial NO synthase knockout mice. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova / Russian Journal of Physiology*. 2026;112(2):429–446. (In Russ.) <https://doi.org/10.7868/S2658655X26020021>

ВВЕДЕНИЕ

Оксид азота (NO) – важная сигнальная молекула, регулирующая многочисленные физиологические процессы. Синтез NO катализируется NO-синтазами (NOS). Идентифицированы и охарактеризованы три изоформы данного фермента: нейрональная (nNOS или NOS1), индуцибельная (iNOS или NOS2) и эндотелиальная (eNOS или NOS3) [1, 2]. Ряд исследований указывает на значительную роль NO и NOS в патогенезе метаболического синдрома, инсулинорезистентности, ожирения и сахарного диабета I и II типов [3–5]. Мыши с тройным нокаутом NOS (n/i/eNOS KO) характеризуются крайне низкой концентрацией метаболитов NO в плазме, и с возрастом у них развивается артериальная гипертензия, системный атеросклероз, абдоминальное ожирение, гипертриглицеридемия, нарушение толерантности к глюкозе и инсулинорезистентность [6]. В почках экспрессируются изоформы NOS1 (α - и β -сплайс-варианты) и NOS3 [7]. В печени NO образуется при участии NOS2 (клетки Купфера, перипортальные гепатоциты) [8, 9] и NOS3 (гепатоциты, эпителий желчных протоков, эндотелий печеночных артерий, терминальных печеночных венул и синусоидов) [8–10]. Данный процесс может опосредовать ряд физиологических и патологических реакций, связанных с функционированием

печени [11]. Нокаут генов *nos1* и *nos3* у мышей может способствовать повышению артериального давления [1, 12]. У мышей с нокаутом *nos1* в клетках плотного пятна (MD-NOS1 KO) [13], а также у мышей с нокаутом *nos1* в собирательных трубках (CD-NOS1 KO) [14, 15] выявлено нарушение натрийуретического ответа на поступление соли и развитие соль-чувствительной гипертензии. У мышей с нокаутом гена *nos3* во всех клетках (NOS3 KO) и нефрон-специфическим нокаутом *nos3* (NS-NOS3 KO) также отмечается тенденция к повышению артериального давления, а при содержании на диете с высоким содержанием соли у них развивается артериальная гипертензия [16, 17]. Мыши с нокаутом *nos2* характеризуются большей массой тела, нарушением системной толерантности к глюкозе, изменением передачи сигналов инсулина в тканях, печеночным глюконеогенезом, повышенным содержанием липидов в печени и избыточным накоплением жировой ткани [18]. Недавно нами была создана линия мышей с нокаутом гена *nos3* (NOS3 KO) и было показано, что эта линия обладает повышенной чувствительностью к петлевому диуретику фуросемиду [19]. Учитывая, что нарушение продукции NO и инактивация генов различных изоформ NOS наиболее часто затрагивает такие органы-мишени, как почки и печень, целью настоящей работы стало исследование морфологии почек и печени, ион-регулирующей функции почек и гликемии у взрослых мышей с нокаутом гена *nos3*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Линия гомозиготных мышей NOS3 KO была получена на основе линии C57Bl/6 с использованием технологии редактирования генома CRISPR-CAS. Процедура получения нокаутной линии описана ранее [19]. Генотип NOS3 KO подтверждали в возрасте 4 недель стандартной ПЦР и секвенированием. В возрасте 2 месяцев мыши были отобраны для физиологических экспериментов. Для наблюдений и физиологических экспериментов использовали мышей в возрасте 2–9 месяцев, содержащихся в виварии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Всего было использовано 49 взрослых животных: 10 самок и 10 самцов линии C57Bl/6; 10 самок и 19 самцов линии NOS3 KO. Животные содержались в клетках с древесной подстилкой по 1–4 особи. Для поддержания стабильных условий среды клетки размещали в системе Noroit A-Vox 120 (Франция) с 12-часовым световым циклом (7:00–19:00 – светлая фаза при освещении люминесцентными лампами; 19:00–7:00 – темная фаза), температурой воздуха 22–25 °С, относительной влажностью 50–60%, фильтрацией воздуха через HEPA и контролируемым воздухообменом. Мыши имели свободный доступ к питьевой воде и корму ЛБК-120 для лабораторных животных (Тосненский комбикормовый завод, Россия).

Для оценки функции почек у 39 мышей NOS3 KO и дикого типа с определенной периодичностью мониторировали уровень экскреции натрия с мочой при свободном доступе к пище (в возрасте 3–4 и 5 месяцев) и натошак (корм изымали за 17 ч до эксперимента; в возрасте 3–4 и 6 месяцев). В возрасте 7 месяцев был проведен тест с солевой нагрузкой (9 мкл/г 5% раствора NaCl перорально). Раствор NaCl вводили через тонкий металлический зонд с шариком на конце. Для сбора мочи при спонтанных мочеиспусканиях в течение 3 ч после нагрузки или в контрольных условиях животных помещали в индивидуальные клетки с проволочными решетчатыми полами и пластиковыми пробирками Эппендорф. Образцы мочи хранили при

температуре 4–8 °С. После каждого эксперимента мышей возвращали в домашние клетки, при этом между экспериментами выдерживали не менее двух недель. Концентрацию натрия в моче определяли методом пламенной фотометрии (фотометр Sherwood-420, Великобритания), концентрацию креатинина – кинетическим методом с щелочным пикратом (автоматический анализатор Erba XL-200, Чехия). Экскрецию натрия оценивали по отношению натрий/креатинин (мкмоль/г).

Уровень гликемии у животных определяли в возрасте 7 месяцев при свободном доступе к пище и натошак (через 17 ч после изъятия корма, при свободном доступе к воде). При свободном доступе животных к корму в течение недели ежедневно оценивали количество съеденного корма. Концентрацию глюкозы в капиллярной крови из кончика хвоста измеряли глюкометром AccuChek Performa Nano с использованием тест-полосок. Так как у самцов линии NOS3 KO был выявлен низкий уровень глюкозы крови в возрасте 7 месяцев, была выполнена отдельная серия исследований на дополнительной группе животных. У 10 самцов NOS3 KO определяли уровень глюкозы крови в возрасте 2,5, 4,5 и 6 месяцев натошак, а также в возрасте 6 месяцев на фоне свободного доступа к пище и при введении донора NO – изосорбида динитрата (Изокет, 1 мг/мл), который вводили в дозе 16 мкл/г внутривенно, концентрацию глюкозы определяли через 30 мин после инъекции.

В возрасте 9 месяцев у животных забирали материал для гистологического анализа почек и печени, а также для оценки содержания гликогена в печени. Голодных мышей анестезировали Телазолом (30 мкг/г), вскрывали брюшную полость, изымали почки и печень, после чего животных выводили из эксперимента декапитацией. Органы отделяли и предварительно фиксировали в 4%-ном параформальдегиде (PFA) в 0,01 М PBS при 4 °С, затем фиксировали в 10%-ном PFA в течение 24 ч и переносили в 70%-ный этанол. Образцы подвергали стандартной проводке через возрастающие концентрации спиртов в автоматическом процессоре Tissue-Tek VIP5Jr (Sakura, Япония), заливали в гистомикс и парафин. Гистологические срезы толщиной 5–7 мкм готовили на микротоме Microm HM340E (Thermo Scientific, Германия). Срезы почек и печени окрашивали гематоксилином и эозином. Дополнительно срезы печени окрашивали реактивом Шиффа (реакция Шиффа, BioVitrum, Россия) для выявления морфологических признаков наличия гликогена. Препараты анализировали с использованием сканера MagScanner kf-fl-005 (KfBio, Китай) при увеличении $\times 20$ или микроскопа Zeiss AxioCam II (Carl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 640$ с последующим компьютерным анализом изображений.

Морфометрическую оценку структур почек и количественный анализ содержания гранул гликогена в клетках печени выполняли с использованием программы ImageJ [20]. Общую площадь коры определяли в мм², рассчитывали число клубочков на мм² коркового вещества. Дополнительно измеряли толщину коркового слоя: для этого срез почки делили на 10 равных секторов и производили 10 измерений расстояния между границей коры и мозгового вещества и наружным краем органа; для статистического анализа использовали среднее значение. Изображения срезов печени (увеличение $\times 640$) конвертировали в монохромные 8-битные изображения. Для выделения пикселей, соответствующих гранулам гликогена, устанавливали порог цветопоглощения 24–30% (в расчет попадали пиксели, соответствующие наиболее интенсивному окрашиванию по PAS внутри клеток). Количество выделенных пикселей суммировали и использовали для сравнительного анализа между контрольной и NOS3 KO группами (4 самца C57Bl/6 и 4 самца NOS3 KO, по 5 срезов от каждого животного).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 8.0. С учетом небольшого объема выборки преимущественно применяли непараметрические статистические методы. На диаграммах разброса (jitter plot) и в тексте данные представлены как медианы с межквартильными размахами (Me, Q1–Q3). Для сравнения независимых и зависимых групп использовали критерий Манна–Уитни или Краскала–Уоллиса с последующим *post-hoc*-тестом Данна и критерий Уилкоксона соответственно. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфофизиологические характеристики почек у мышей NOS3 KO. У мышей NOS3 KO в возрасте 3–4 и 5–6 месяцев ни в состоянии натощак, ни при свободном доступе к пище не наблюдалось значимых отличий от мышей дикого типа по экскреции натрия с мочой; экскреция натрия, нормированная на уровень креатинина, также была сопоставимой у мышей NOS3 KO и C57Bl/6 (рис. 1). В возрасте 7-ми месяцев животным была выполнена нагрузочная проба с пероральным введением 5%-ного раствора хлорида натрия в объеме 9 мкл/г (соответствует 7,7 мкмоль/г), которая моделировала избыточное поступление натрия в организм. В ответ на нагрузку NaCl экскреция натрия возрастала в 10 раз по сравнению с уровнем, характерным для мышей обеих линий при свободном доступе к стандартному лабораторному корму и при 17-часовой пищевой депривации. Отсутствие межлинейных различий в экскреции натрия, нормированной на креатинин, после нагрузочной пробы (рис. 1) свидетельствует о сохранности натрийуретической функции почек у самок и самцов мышей NOS3 KO и об адекватном ответе почек на положительный баланс натрия в организме.

Гистологический анализ (рис. 2) показал нормальную морфологию почек у мышей NOS3 KO: четко выраженные корковое и мозговое вещество, нормальная плотность клубочков, неизменные клетки канальцевого эпителия (рис. 2д–з). Отмечены половые морфологические различия: у самцов были выявлены меньшая плотность клубочков (меньшее количество клубочков на единицу площади, рис. 3а) и более толстый слой коркового вещества (рис. 2б, г, е, з; рис. 3б), при этом толщина мозгового вещества у самцов и самок мышей не различалась. Эти половые особенности наблюдались как у мышей дикого типа, так и у NOS3 KO.

Морфофизиологические характеристики печени у мышей NOS3 KO. Уровень глюкозы в крови у животных с доступом к пище находился в диапазоне 5–12 мМ, медиана составила 8,3 мМ у мышей C57Bl/6 и 7,6 мМ у мышей NOS3 KO. После 17 ч голодания уровень глюкозы снизился до 6,3 мМ у мышей дикого типа и до 4,3 мМ у мышей NOS3 KO (рис. 4а). Наиболее выраженное снижение гликемии отмечалось у самцов NOS3 KO, которые имели более низкий уровень глюкозы даже в состоянии свободного доступа к пище и развивали гипогликемию натощак (глюкоза < 3,5 мМ у большинства животных) (рис. 4а). Суточное потребление пищи статистически значимо не различалось между мышами NOS3 KO и C57Bl/6 (рис. 4б). Самцы NOS3 KO съедали больше корма, чем самки, в расчете на животное (рис. 4б), что обусловлено различиями в размере; та же тенденция наблюдалась и для мышей дикого типа.

Гистологический анализ печени показал отсутствие признаков ее поражения у мышей NOS3 KO (рис. 5). При использовании окраски по Шиффу рассчитывали площадь изображения гистологического среза печени, занимаемую пикселями, соответствующими окрашиванию на гликоген. Установлено, что у голодавших

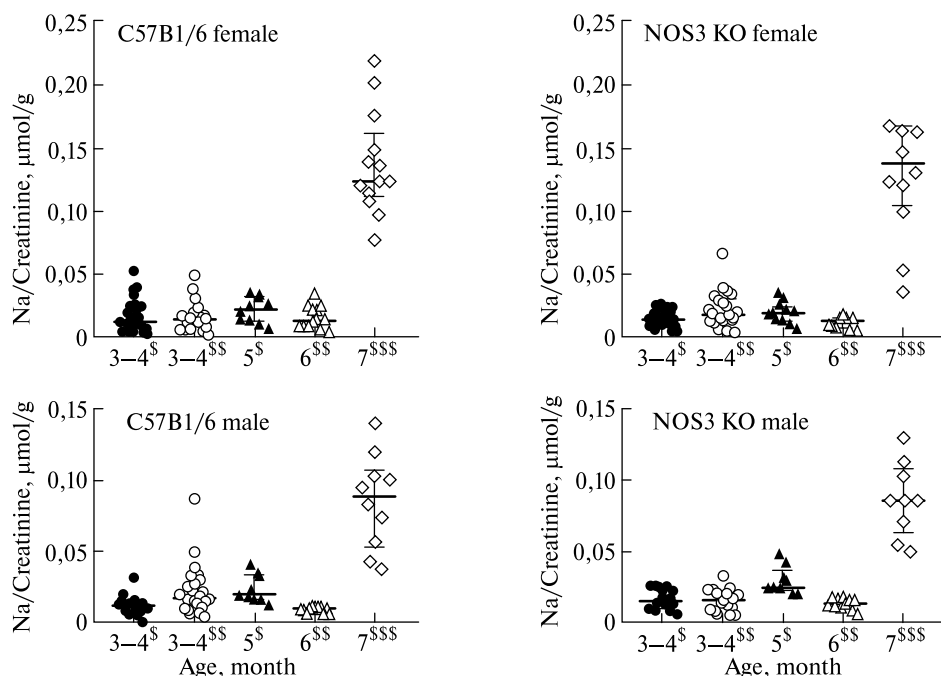


Рис. 1. Отношение экскреции с мочой натрия к креатинину у самок и самцов мышей C57Bl/6 и NOS3 KO в возрасте 3–7 месяцев. ^S – свободный доступ к корму, ^{SS} – ограничение доступа к корму за 17 ч, ^{SSS} – нагрузочная проба с введением раствора NaCl

Fig. 1. The ratio of urinary sodium excretion to creatinine in female and male C57Bl/6 and NOS3 KO mice aged 3–7 months. ^S – free access to food, ^{SS} – restricted access to food for 17 hours, ^{SSS} – NaCl solution load test

самцов NOS3 KO содержание печеночного гликогена было достоверно снижено (рис. 5б, е–ж).

На отдельной группе самцов мышей NOS3 KO была прослежена гликемия натощак в разном возрасте. Выявлено, что не только у мышей старшего возраста часто наблюдается гипогликемия (рис. 4а), но и в возрасте 2,5–6-ти месяцев (рис. 6). Уровень гликемии значимо возрастал на фоне введения донора NO изосорбида динитрата (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

NOS3 функционирует как в канальцевых клетках, так и в эндотелиальных клетках сосудов почки. Ранее было показано, что у мышей NOS3 KO наблюдаются уменьшенные размеры тела и измененная реакция на фуросемид, однако при этом сохраняется нормальная экскреция азотистых продуктов и натрия [19]. Такие изменения могут быть как следствием нарушенной активности NOS3 в канальцевых клетках или других структурах почки, так и результатом ответа почек на системные изменения, например гемодинамические нарушения [17, 21, 22] или метаболические сдвиги [21, 23], связанные с дефицитом NOS3.

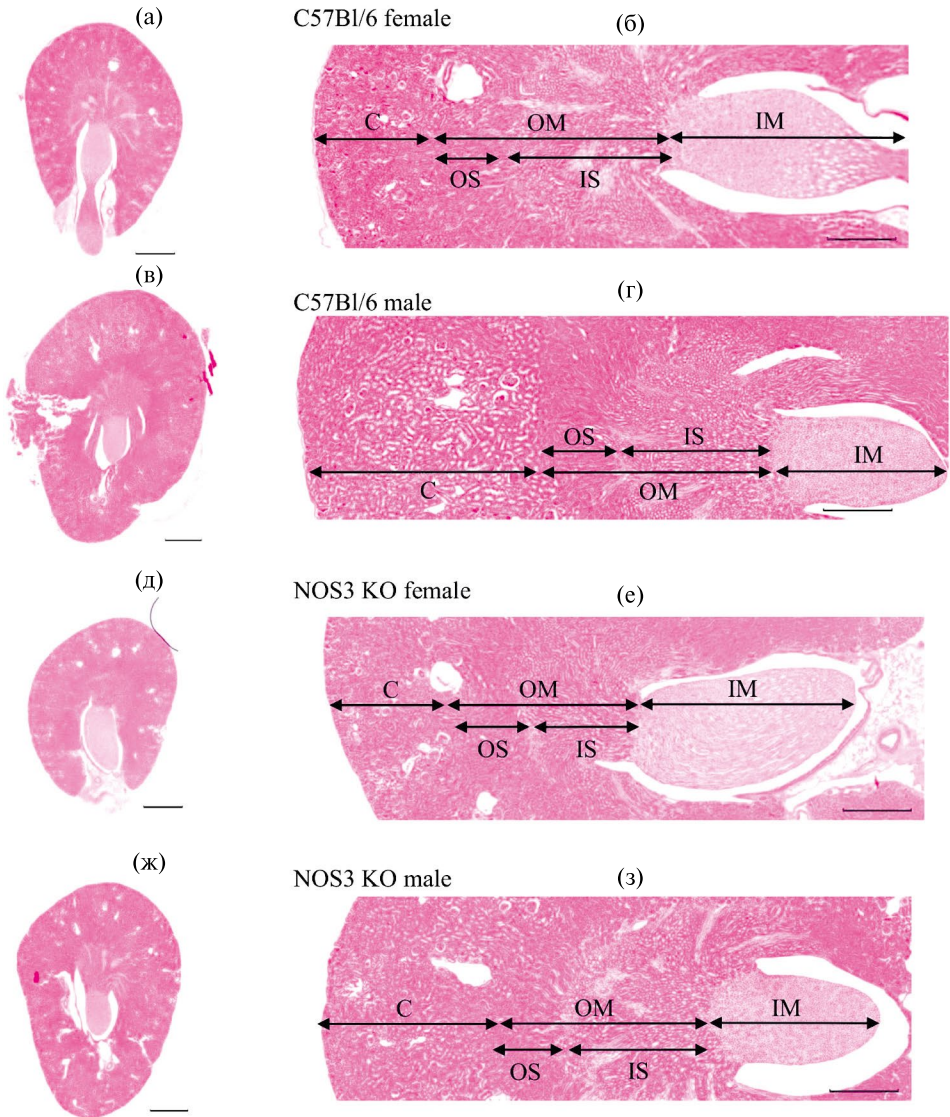


Рис. 2. Микроскопическая анатомия почек у мышей C57Bl/6 (а–г) и NOS3 KO (д–з) в возрасте 9 месяцев. Фронтальный срез через середину почки; окрашивание гематоксилином и эозином; масштаб на изображениях (а), (в), (д), (ж): 1 мм, масштаб на изображениях (б), (г), (е), (з): 500 мкм. Стрелками показано корковое вещество (C), наружное мозговое вещество (OM) и его наружная (OS) и внутренняя (IS) полоски, внутреннее мозговое вещество (IM)

Fig. 2. Microscopic anatomy of the kidneys in C57Bl/6 mice (а–г) and NOS3 KO mice (д–з) at 9 months of age. Frontal section through the middle of the kidney; hematoxylin and eosin staining; scale bar in images (а), (в), (д), (ж): 1 mm; scale bar in images (б), (г), (е), (з): 500 μm. Arrows indicate the cortex (C), the outer medulla (OM), and its outer (OS) and inner (IS) stripes, and the inner medulla (IM)

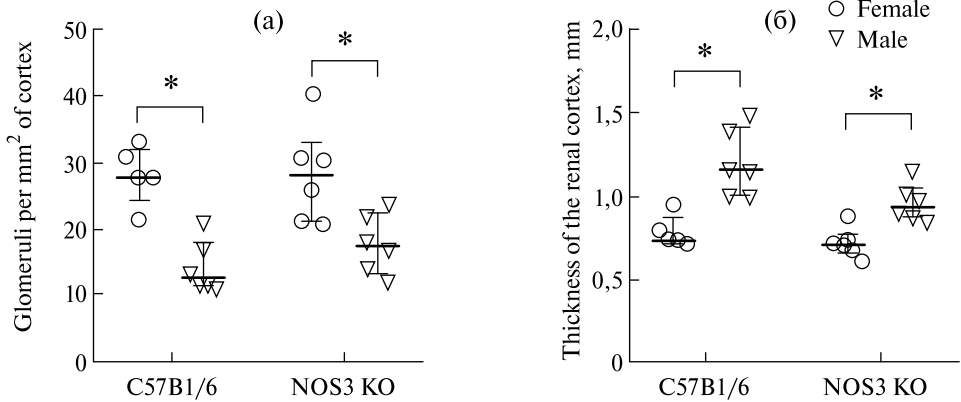


Рис. 3. Морфометрические характеристики почек у мышей C57Bl/6 и NOS3 KO в возрасте 9 месяцев. * – статистически значимые различия ($p < 0,05$, критерий Манна–Уитни)

Fig. 3. Morphometric characteristics of the kidneys in C57Bl/6 and NOS3 KO mice at 9 months of age. * – statistically significant differences ($p < 0.05$, Mann–Whitney test)

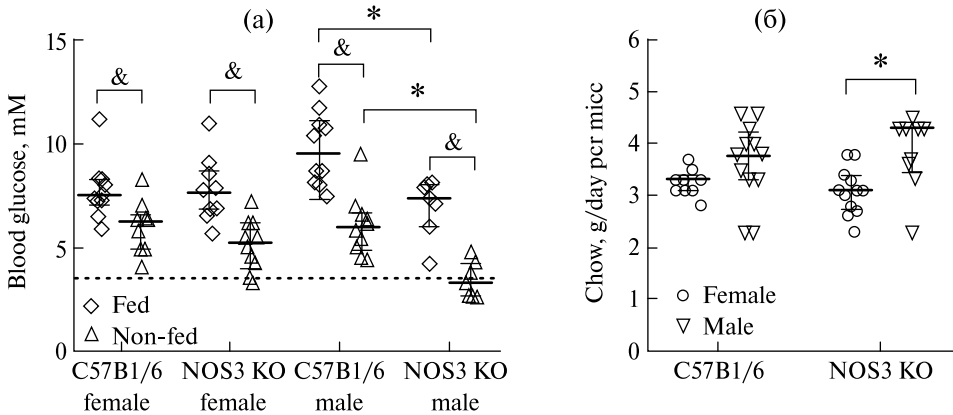


Рис. 4. Уровень глюкозы крови натощак или при свободном доступе к пище (а) и потребление корма в сутки (б) у мышей C57Bl/6 и NOS3 KO в возрасте 7-ми месяцев. Fed – мыши со свободным доступом к пище, Non-fed – мыши после 17-часовой пищевой депривации. Пунктирная линия – нижняя граница нормального уровня глюкозы крови. Статистически значимые различия ($p < 0,05$): * – тест Данна, & – знаковый ранговый тест Уилкоксона

Fig. 4. Fasting blood glucose levels or levels with free access to food (a) and daily food intake (б) in 7-month-old C57Bl/6 and NOS3 KO mice. Fed: mice with free access to food, non-fed: mice after 17 hours of food deprivation. The dotted line represents the lower limit of normal blood glucose levels. Statistically significant differences ($p < 0.05$): * – Dunn test, & – Wilcoxon signed-rank test

Важным представлялся вопрос о влиянии нокаута гена *nos3* на развитие почек. Наши данные свидетельствуют о том, что дефект NOS3 не нарушает размеры или структуру почек; формирование почечных сосудов, клубочков и канальцев нефронов происходит без нарушений. Единственные выявленные структурные различия почек у изученных групп мышей были половыми: у самцов обеих линий

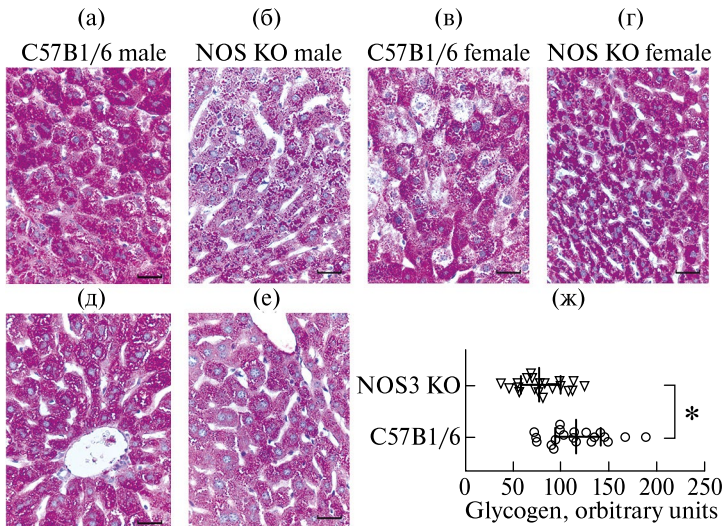


Рис. 5. Гистологическое исследование печени (а–е) и оценка содержания гликогена в печени (ж) у мышей C57B1/6 и NOS3 KO в возрасте 9-ти месяцев. Окрашивание гематоксилином и эозином и реакция Шиффа для детекции гликогена; масштаб на изображениях (а–е): 50 мкм. На рисунках (а), (б), (д), (е), (ж) приведены данные для самцов (male), на рисунках (в), (г) – для самок (female). * – статистически значимые различия ($p < 0,05$, тест Манна–Уитни)

Fig. 5. Histological examination of the liver (a–e) and assessment of the liver glycogen content (ж) in 9-month-old C57B1/6 and NOS3 KO mice. Hematoxylin and eosin staining and Schiff's reaction for glycogen detection; scale bar in (a–e): 50 μm . Figures (a), (б), (д), (е), (ж) show data for males, and figures (в) and (г) show data for females. * – statistically significant differences ($p < 0.05$, Mann–Whitney test)

почки были больше, с более толстым корковым слоем и меньшей плотностью клубочков вследствие увеличенного объема коры. Эти различия согласуются с ранее описанным ускоренным ростом почек у самцов на 30–40-й день после рождения, индуцированным активацией андрогенных рецепторов в почечных клетках [24, 25]. Недавние исследования с использованием секвенирования РНК единичных клеток (single cell sequencing) почек взрослых самцов и самок мышей и оценки экспрессии *in situ* и прослеживанием клеточных линий выявили клеточное разнообразие и выраженные половые различия в экспрессии генов в структурах нефрона, особенно в отношении мембранных транспортеров растворенных веществ и ферментов [26, 27]. Среди них – гены, связанные с функциями проксимальных канальцев, включая транспорт органических анионов (*Slc22a6* и *Slc22a8*) и аминокислот (*Slc7a12* и *Slc7a13*), метаболизм лекарств (*Fmo5* и *Cyp4a14*), холестерина (*Cyp7b1*) и гормонов (*Agt* и *Hsd17b2*) [26, 27]. Важно отметить, что дефицит NOS3 не изменял половые особенности гипертрофии или гиперплазии почек у самцов.

Функционально экскреция натрия у мышей NOS3 KO в возрасте 3–7-ми месяцев оставалась нормальной как в условиях голодания, так и при свободном доступе к пище и при солевой нагрузке. Однако в литературе сообщается, что при хронической перегрузке солью дефицит NOS3 может нарушать экскрецию натрия

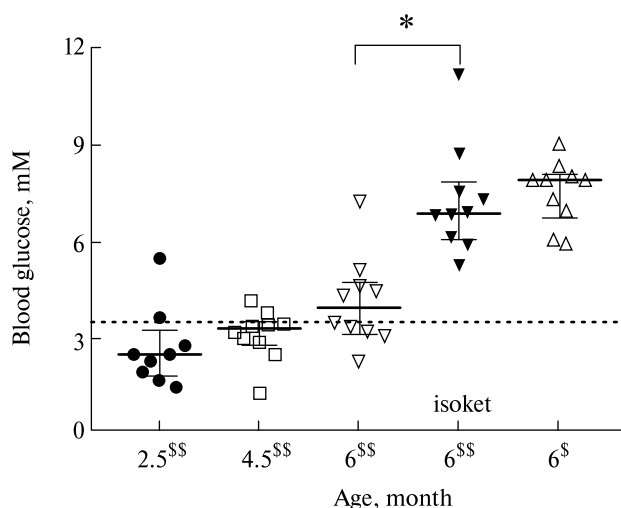


Рис. 6. Уровень глюкозы крови натощак или при свободном доступе к пище и эффект изосорбида динитрата у самцов мышей NOS3 KO. Isoket – 30 мин после инъекции 16 мкл/г изосорбида динитрата. ^S – свободный доступ к корму, ^{SS} – ограничение доступа к корму за 17 ч. Пунктирная линия – нижняя граница нормального уровня глюкозы крови. * – статистически значимые различия ($p < 0,05$, знаковый ранговый тест Уилкоксона)

Fig. 6. Fasting blood glucose levels or with free access to food and the effect of isosorbide dinitrate in male NOS3 KO mice. Isoket – 30 min after injection of 16 μ l/g of isosorbide dinitrate. ^S – free access to food, ^{SS} – food restricted for 17 h. Dashed line – lower limit of normal blood glucose levels. * – statistically significant differences ($p < 0,05$, Wilcoxon signed-rank test)

и способствовать развитию гипертензии. Так, у мышей NS-NOS3 KO была выявлена задержка выведения избытка натрия после острой солевой нагрузки по сравнению с мышами дикого типа; при содержании на диете с высоким содержанием соли у них отмечались сниженные уровни ренина и уменьшенная экскреция натрия [17]. Различия могут быть обусловлены особенностями протоколов солевой нагрузки или вкладом системного синтеза NO. Что касается механизма развития артериальной гипертензии у мышей NOS3 KO, то, по-видимому, основным патогенетическим фактором является не задержка натрия в организме, а нарушение регуляции сосудистого тонуса при участии NO.

Впервые нами была обнаружена гипогликемия натощак у гомозиготных самцов NOS3 KO. У этих животных наблюдались сниженные уровни глюкозы как при свободном доступе к пище, так и в условиях голодания, а также уменьшенное содержание печеночного гликогена после голодания. Поскольку уровень гликогена измерялся только после голодания, остается неясным, имели ли мыши изначально более низкий запас гликогена, или же они быстрее его расходовали. Пищевое поведение у мышей NOS3 KO не изменялось, при свободном доступе к корму они потребляли столько же корма, как и мыши дикого типа.

В ряде исследований на мышях с дефектами различных изоформ NO-синтазы описывались разнообразные и часто противоположные изменения углеводного и липидного обмена [3, 5, 18, 28]. У NOS3 KO мышей были отмечены более низкие уровни гликемии, что ассоциировалось с развитием ожирения, жировой

дистрофии печени и увеличением запасов гликогена в печени [28]. Однако в упомянутом исследовании не было ясно указано, при каких условиях (натошак или нет) печень отбиралась для анализа гликогена. Ранее метаболические нарушения были описаны не только у мышей с дефектом NO-синтаз, но и у их потомства. В частности, у самцов, чьи отцы имели дефект синтеза NO, наблюдались повышенные уровни инсулина натошак и усиленная секреция инсулина в ответ на глюкозотолерантный тест. Показано, что материнский дефицит NOS3 вызывает жировую дистрофию печени и более низкие уровни глюкозы натошак у самок потомства дикого типа, что свидетельствует о влиянии родительских генетических вариантов на фенотип потомков через эпигенетические механизмы, несмотря на отсутствие первичного генетического дефекта у потомства [29]. Описан ряд эпигенетических изменений, влияющих на экспрессию генов, связанных с углеводным и липидным обменом у потомства родителей с дефектом NO-синтазы. У потомков дикого типа от отцов-гетерозигот по нокауту NOS3 дифференциальная экспрессия была выявлена для 12 генов у самцов и для 3 генов у самок [30]. Среди них – ген *pgc1a*, гены, кодирующие транскрипционный фактор B2 (ген *tfb2m*), углевод-ответственный элемент-связывающий белок, глюкокортикоидный рецептор (ГР, ген *nr3c1*), митохондриальный транскрипционный фактор A, глюкозо-6-фосфатаза, транспортер глюкозы 2, инсулиноподобный фактор роста 2 и др. На основании экспериментальных данных считается, что *tfb2m* играет критическую роль в секреции инсулина [31]. Повышенная печеночная экспрессия генов *nr3c1* и *pgc1a* вследствие изменения метилирования может приводить к возрастанию уровня инсулина, так как ГР взаимодействует с ферментом, разрушающим инсулин. Андроген-зависимый эффект ГР на печеночный клиренс инсулина может объяснить повышенные уровни инсулина плазмы крови у самцов потомков дикого типа от отцов-гетерозигот NOS3 KO [29].

В совокупности наши данные и данные литературы показывают, что у мышей NOS3 KO значительно изменяется активность различных ферментов и транспортеров, участвующих в углеводном и липидном обмене. Часть этих изменений может быть обусловлена прямым дефектом NO-синтазы, а часть – эпигенетическими изменениями, модифицирующими активность других ферментов. Наши мыши NOS3 KO являются гомозиготами по мутации в гене *nos3*, и поэтому у них можно ожидать не только генетических, но и эпигенетических изменений в функционировании различных генов вследствие родительского дефекта NOS. В дальнейшем необходимо учитывать спектр изменений в экспрессии генов, ответственных за синтез эффекторных белков углеводного обмена.

Таким образом, у мышей NOS3 KO сохраняются нормальная структура почек и функция экскреции натрия как в базовых условиях, так и при солевой нагрузке. Гистологически выявлено сохранение кортико-медуллярной организации без патологических изменений. Нокаут гена *nos3* не повлиял на характерные для мышей половые различия в строении почек. Самцы NOS3 KO демонстрируют выраженную тенденцию к развитию гипогликемии натошак и снижению запасов гликогена в печени. Фармакологическая коррекция уровня оксида азота введением донора NO приводит к повышению уровня гликемии у самцов NOS3 KO. Эти результаты указывают на изменения углеводного обмена у мышей с дефицитом NOS3, вероятно, обусловленные как генетическими, так и эпигенетическими механизмами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Huang P.L. Mouse models of nitric oxide synthase deficiency. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000;**11**(Suppl 2):S120–S123. https://doi.org/10.1681/ASN.V11suppl_2s120
2. Hosseini N., Kourosh-Arami M., Nadjafi S. et al. Structure, distribution, regulation, and function of splice variant isoforms of nitric oxide synthase family in the nervous system. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2022;**23**:510–534. <https://doi.org/10.2174/1389203723666220823151326>
3. Fujimoto M., Shimizu N., Kunii K. et al. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes.* 2005;**54**:1340–1348. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.5.1340>
4. Ha S.-K., Chae C. Inducible nitric oxide distribution in the fatty liver of a mouse with high-fat diet-induced obesity. *Exp. Anim.* 2010;**59**:595–604. <https://doi.org/10.1538/expanim.59.595>
5. Shinozaki S., Choi C.S., Shimizu N. et al. Liver-specific inducible nitric-oxide synthase expression is sufficient to cause hepatic insulin resistance and mild hyperglycemia in mice. *J. Biol. Chem.* 2011;**286**:34959–34975. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187666>
6. Tsutsui M., Shimokawa H., Morishita T. et al. Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases. *J. Pharmacol. Sci.* 2006;**102**:147–154. <https://doi.org/10.1254/jphs.CPJ06015X>
7. Liu R., Juncos L.A., Lu Y. et al. The role of macula densa nitric oxide synthase 1 beta splice variant in modulating tubuloglomerular feedback. In: Y.S. Prakash (ed.) *Comprehensive Physiology*. Wiley; 2023, Pp. 4215–4229.
8. Leifeld L., Fielenbach M., Dumoulin F.-L. et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in fulminant hepatic failure. *J. Hepatol.* 2002;**37**:613–619. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(02\)00271-4](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(02)00271-4)
9. McNaughton L., Puttagunta L., Martinez-Cuesta M.A. et al. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;**99**:17161–17166. <https://doi.org/10.1073/pnas.0134112100>
10. Cunningham R.P., Moore M.P., Dashek R.J. et al. Critical role for hepatocyte-specific eNOS in NAFLD and NASH. *Diabetes.* 2021;**70**:2476–2491. <https://doi.org/10.2337/db20-1228>
11. Shi-Jobgen W., Fried S.K., Fu W.J. et al. Regulatory role for the arginine–nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J. Nutr. Biochem.* 2006;**17**:571–588. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.12.001>
12. Hyndman K.A., Pollock J.S. Nitric oxide and the A and B of endothelin of sodium homeostasis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2013;**22**:26–31. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32835b4edc>
13. Lu Y., Wei J., Stec D.E. et al. Macula densa nitric oxide synthase 1 β protects against salt-sensitive hypertension. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2016;**27**:2346–2356. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015050515>

14. Hyndman K.A., Boesen E.I., Elmarakby A.A. et al. Renal collecting duct NOS1 maintains fluid–electrolyte homeostasis and blood pressure. *Hypertension*. 2013;**62**:91–98. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01291>
15. Hyndman K.A., Mironova E.V., Giani J.F. et al. 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*. 2017;**6**:e006896. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006896>
16. Kopkan L., Hess A., Husková Z. et al. High-salt intake enhances superoxide activity in eNOS knockout mice leading to the development of salt sensitivity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2010;**299**:F656–F663. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00047.2010>
17. Gao Y., Stuart D., Takahishi T. et al. Nephron-specific disruption of nitric oxide synthase 3 causes hypertension and impaired salt excretion. *J. Am. Heart. Assoc*. 2018;**7**(14):e009236. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.009236>
18. Kanuri B.N., Kanshana J.S., Rebello S.C. et al. Altered glucose and lipid homeostasis in liver and adipose tissue predispose inducible NOS knockout mice to insulin resistance. *Sci. Rep*. 2017;**7**:41009. <https://doi.org/10.1038/srep41009>
19. Kutina A.V., Belyakov G.V., Balbotkina E.V. et al. Nos3 gene knockout in mice enhances kidney sensitivity to furosemide. *J. Evol. Biochem. Phys*. 2025;**61**:573–582. <https://doi.org/10.1134/S0022093025020139>
20. Collins T.J. ImageJ for microscopy. *BioTechniques*. 2007;**43**(Suppl. 1):S25–S30. <https://doi.org/10.2144/000112517>
21. Takahashi T., Harris R.C. Role of endothelial nitric oxide synthase in diabetic nephropathy: lessons from diabetic eNOS knockout mice. *J. Diabetes Res*. 2014;**2014**:590541. <https://doi.org/10.1155/2014/590541>
22. Kosugi T., Heinig M., Nakayama T. et al. eNOS knockout mice with advanced diabetic nephropathy have less benefit from renin-angiotensin blockade than from aldosterone receptor antagonists. *Am. J. Pathol*. 2010;**176**:619–629. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090578>
23. Nisoli E., Clementi E., Paolucci C. et al. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*. 2003;**299**:896–899. <https://doi.org/10.1126/science.1079368>
24. Jean-Faucher Ch., Berger M., Gallon Ch. et al. Sex-related differences in renal size in mice: ontogeny and influence of neonatal androgens. *J. Endocrinol*. 1987;**115**:241–246. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1150241>
25. Laouari D., Vergnaud P., Hirose T. et al. The sexual dimorphism of kidney growth in mice and humans. *Kidney Int*. 2022;**102**:78–95. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2022.02.027>
26. Ransick A., Lindström N.O., Liu J. et al. Single-cell profiling reveals sex, lineage, and regional diversity in the mouse kidney. *Dev. Cell*. 2019;**51**:399–413.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.10.005>
27. Chen L., Chou C.-L., Yang C.-R. et al. Multiomics analyses reveal sex differences in mouse renal proximal subsegments. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2023;**34**:829–845. <https://doi.org/10.1681/ASN.0000000000000089>

28. Schild L., Dombrowski F., Lendeckel U. et al. Impairment of endothelial nitric oxide synthase causes abnormal fat and glycogen deposition in liver. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2008;**1782**:180–187. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.12.007>
29. Hocher B., Lu Y.-P., Reichetzeder C. et al. Paternal eNOS deficiency in mice affects glucose homeostasis and liver glycogen in male offspring without inheritance of eNOS deficiency itself. *Diabetologia.* 2022;**65**:1222–1236. <https://doi.org/10.1007/s00125-022-05700-x>
30. Zhang X., Reichetzeder C., Liu Y. et al. Parental sex-dependent effects of either maternal or paternal eNOS deficiency on the offspring's phenotype without transmission of the parental eNOS deficiency to the offspring. *Front. Physiol.* 2023;**14**:1306178. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1306178>
31. Fex M., Nicholas L.M., Vishnu N. et al. The pathogenetic role of β -cell mitochondria in type 2 diabetes. *J. Endocrinol.* 2018;**236**(3):R145–R159. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0367>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кутина Анна Вячеславовна — канд. мед. наук; гл. науч. сотр., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук; ст. науч. сотр., Центр трансгеноза и редактирования генома Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Российская Федерация;
E-mail: kutina_anna@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8970-9854>

Беляков Григорий Викторович — ст. лаб.-иссл., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация
E-mail: grisha010933@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0005-8814-3026>

Балботкина Евгения Владимировна — канд. мед. наук; науч. сотр., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация
E-mail: liravega@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8635-8131>

Вишнякова Полина Александровна — канд. биол. наук; зав. лаб., Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Российская Федерация
E-mail: vishnyakova_pa@pfur.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8650-8240>

Косырева Анна Михайловна — докт. биол. наук; проф., Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Российская Федерация
E-mail: kosyreva.a@list.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6182-1799>

Чиринская Ангелина Валерьевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр., Центр трансгенеза и редактирования генома Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Российская Федерация
E-mail: st035126@student.spbu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7466-0680>

Сопова Юлия Викторовна — канд. биол. наук; вед. науч. сотр., Центр трансгенеза и редактирования генома Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Российская Федерация
E-mail: y.sopova@spbu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7825-273X>

Леонова Елена Ивановна — канд. биол. наук, дир., Центр трансгенеза и редактирования генома Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Российская Федерация
E-mail: e.leonova@spbu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0236-3302>

Поступила в редакцию 06.10.2025
После доработки 22.10.2025
Принята к публикации 22.10.2025

ABOUT THE AUTHORS

Kutina, Anna V. — Cand. Sc. (Medicine); Chief Researcher, I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences; Senior Researcher, Center for Transgenesis and Genome Editing at Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russian Federation
E-mail: kutina_anna@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8970-9854>

Belyakov, Grigoriy V. — Senior Research Assistant, I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation
E-mail: grisha010933@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0005-8814-3026>

Balbotkina, Evgenia V. — Cand. Sc. (Medicine); Researcher, I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation
E-mail: liravega@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8635-8131>

Vishnyakova, Polina A. — Cand. Sc. (Biology); Head of the Laboratory, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: vishnyakova_pa@pfur.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8650-8240>

Kosyreva, Anna M. — Doct. Sc. (Biology); Prof., Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

E-mail: kosyreva.a@list.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6182-1799>

Chirinskaite, Angelina V. — Cand. Sc. (Biology); Junior Researcher, Center for Transgenesis and Genome Editing at Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russian Federation

E-mail: st035126@student.spbu.ru

<https://orcid.org/0000-0002-7466-0680>

Sopova, Julia V. — Cand. Sc. (Biology); Leading Researcher, Center for Transgenesis and Genome Editing at Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russian Federation

E-mail: y.sopova@spbu.ru

<https://orcid.org/0000-0002-7825-273X>

Leonova, Elena I. — Cand. Sc. (Biology); Director, Center for Transgenesis and Genome Editing at Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russian Federation

E-mail: e.leonova@spbu.ru

<https://orcid.org/0000-0002-0236-3302>

Received October 06, 2025

Revised October 22, 2025

Accepted October 22, 2025