

**ГАНЦОВА
ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА**

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НОКАУТА ГЕНА РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ
IRR НА ГИСТОЛОГИЧЕСКУЮ СТРУКТУРУ И ТРАНСКРИПТОМ ПОЧКИ**

1.5.22. Клеточная биология

1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва 2025

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского" и Государственный Научный Центр Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

Научные руководители доктор медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией роста и развития НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ "РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского"

Ельчанинов Андрей Владимирович

доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН

Деев Игорь Евгеньевич

Официальные оппоненты

доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры, и.о. заведующего кафедрой гистологии с эмбриологией имени П.В. Дунаева Тюменского государственного медицинского университета

Шидин Владимир Александрович

кандидат медицинских наук заведующая лабораторией физиологии почки и водно-солевого обмена ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН

Кутина Анна Вячеславовна

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Защита состоится «__» _____ 2025 г. в ____ на заседании диссертационного совета ПДС 0300.027 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 10/2, ауд. 730

С диссертацией можно ознакомиться в Учебно-научном информационном библиотечном центре (Научной библиотеке) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайтах <https://vak.minobrnauki.gov.ru/> и <https://www.rudn.ru/science/dissovset/>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета ПДС 0300.027

доктор биологических наук

Косырева Анна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Одним из важнейших свойств живого организма является поддержание оптимального кислотно-щелочного равновесия внутренней среды, необходимого для жизнедеятельности клеток в условиях влияния внешних и внутренних факторов. В организме человека строго поддерживается физиологический уровень pH, однако для различных тканей и биологических жидкостей организма его уровень значительно варьирует. Так, например, нормальные значения pH крови – 7,36 до 7,44; для желудочного сока от 0,7 до 2; для секрета поджелудочной железы от 8,0 до 9,0; для слюны около 7,0; для мочи от 5,0 до 9,0 [Ali, 2014].

Регуляция уровня кислот и оснований обеспечивается множеством молекулярных механизмов, большая часть из которых до сих пор не изучены. Одним из сенсоров щелочного pH является рецептор, подобный рецептору инсулина IRR. Рецептор IRR, представляет собой рецепторную тирозинкиназу, относящуюся к семейству инсулиновых рецепторов, в который так же входят инсулиновый рецептор (IR) и рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R) [Деев и др., 2023]. Уникальной чертой этого семейства рецепторов является их предимеризованное состояние; при взаимодействии с лигандом происходят конформационные изменения, приводящие к активации рецептора через автофосфорилирование [Petrenko и др., 2013a]. Для рецептора IRR не был выявлен лиганд белковой природы, поэтому в литературе его обозначают, как «сиротский» рецептор [Clerk, Sugden, 2022]. В ходе экспериментов по выявлению эндогенного лиганда IRR было обнаружено, что этот рецептор может напрямую активироваться в слабощелочной внеклеточной среде [Deyev и др., 2013]. Рецептор IRR демонстрирует активацию при показателях pH, превышающих 7.9. Хотя в современных физиологических концепциях такие значения принято считать выходящими за рамки норм внутренней среды организма, реальные показатели кислотно-щелочного баланса биологических жидкостей остаются недостаточно исследованными [Petrenko и др., 2013c].

Наибольшее количество IRR обнаружено в почке, где IRR экспрессируется в β -вставочных клетках, выстилающих собирательные трубки нефрона, которые секретируют бикарбонат [Ozaki и др., 1997], [Bates и др., 1997]. Дополнительные зоны экспрессии рецептора IRR включают: энтерохромаффиноподобные элементы слизистой желудка, эндокринные клетки поджелудочной железы (альфа- и бета-клетки островкового аппарата) [Deyev и др., 2017] [Li и др., 2013]. С использованием метода РНК-секвенирования отдельных клеток показана экспрессия IRR в нейронах спинномозговых ганглиев мышей [Usoskin и др., 2015]. Рецепторная тирозинкиназа IRR связана с репродуктивной системой и ранним эмбриональным развитием [Gantsova и др., 2022]. В процессе раннего эмбриогенеза обнаружена экспрессия гена рецептора IRR (*insrr*), а также других членов семейства инсулинового рецептора – IR (*insr*) и IGF-IR (*igf1*) [Brusentsev и др., 2021], на стадии одноклеточных эмбрионов мыши и на стадии бластоцисты [Erickson, Strnatka, 2011]. Также известно, что IRR экспрессируется в большом количестве на пренатальных стадиях развития мыши в ганглиях тройничного, языкоглоточного и спинномозговых нервов, и клетках островков поджелудочной железы, в меньшем количестве в почечных канальцах [Diez-Roux и др., 2011].

Механизм действия и функция рецептора IRR как сенсора щелочного pH в почке и других органах не установлены. Для исследования физиологической роли рецептора IRR получена уникальная линия нокаутных по гену *insrr* мышей [Kitamura и др., 2001b]. До настоящего времени фенотип мышей при инактивации гена *insrr* мало изучен. Показано, что у мышей с нокаутом по гену *insrr* в условиях щелочной нагрузки наблюдается нарушение секреции бикарбоната [Deyev и др., 2011], а именно выведение его с мочой, что свидетельствует о роли рецепторной тирозинкиназы IRR в регуляции кислотно-щелочного равновесия в организме. При этом влияние инактивации гена *insrr* на гистологическое строение почки не изучено. Нарушение выведения бикарбоната может влиять на систему органных макрофагов, так как в настоящее время установлено, что про- или противовоспалительное состояние макрофагов зависит от значений pH [Chen и др.; Wu и др., 2019]. Однако данных, касающихся

состояние почечных макрофагов, у животных, с инактивированным геном *insrr* нет. Использование животной модели с нокаутом гена *insrr* позволит определить физиологическую роль этого рецептора, влияние на гистологическое строение и состояние различных клеточных популяций почки. Исследование профиля экспрессии генов в почке позволит определить влияние инактивации рецептора IRR в процессах клеточного метаболизма и клеточной сигнальной системы.

Степень разработанности темы

Рецептор, подобный рецептору инсулина (далее IRR) – рецепторная тирозинкиназа, входящая в семейство рецептора инсулина. Обычно, лигандами являются крупные белковые молекулы [Yang, Chen, Zhang, 2022], однако для IRR до сих пор не установлен подобный лиганд. В результате экспериментов по поиску эндогенного лиганда IRR было установлено, что IRR может напрямую активироваться слабощелочной внеклеточной средой, что разительно отличает рецептор от других рецепторных тирозинкиназ, которые имеют лиганды белковой или пептидной природы [Deyev и др., 2013].

Функцию IRR как сенсора щелочной внеклеточной среды подтверждают физиологические эксперименты. У мышей, нокаутных по гену *insrr*, щелочная нагрузка на организм сопровождалась метаболическим алкалозом и пониженной секрецией бикарбоната в мочу [Деев и др., 2011]. Животные дикого типа и с инактивацией гена *insrr* по-разному реагировали на острый экспериментальный алкалоз, вызванный внутривенным введением 1,3% раствора бикарбоната в кровь [Petrenko и др., 2013b]. Таким образом, инактивация гена с помощью его нокаута может послужить моделью для исследования щелочной терапии и метаболического алкалоза. Уже известно, что клинические испытания на пациентах с хронической болезнью почек (ХБП) поставили вопрос о возможном терапевтическом использовании бикарбоната натрия (NaHCO_3). Некоторые клинические и фундаментальные научные исследования продемонстрировали благотворное влияние NaHCO_3 на замедление снижения функциональности почек [Alva и др., 2020; Dubey и др., 2020; Iorio Di и др., 2019]. Однако физиологические механизмы, посредством которых бикарбонатная нагрузка защищает почки, остаются неясными. Использование моделей животных дает возможность проводить более целенаправленные интервенционные исследования для выявления механизмов, которые могут опосредовать защиту почек под действием щелочной среды [Mannon, O'Connor, 2020].

Линия мышей, нокаутных по гену *insrr* была получена ранее, и исследована в работе Т. Kitamura [Kitamura и др., 2001b; Nef и др., 2003a]. В них рассмотрены островковые клетки поджелудочной железы и развитие гонад при инактивации генов рецепторов инсулинового семейства. S. Nef и соавторы показали, что семейство тирозинкиназ инсулиновых рецепторов необходимо для появления мужских гонад и, следовательно, для мужской половой дифференциации. XY мыши, мутантные по всем трем рецепторам, развивают яичники и демонстрируют полностью женский фенотип. Сниженная экспрессия как гена *Sry*, так и раннего специфического маркера яичка *Sox9* указывает на то, что инсулиновый сигнальный путь необходим для определения мужского пола [Nef и др., 2003b].

Несмотря на то, что почка является основным органом поддержания кислотно-щелочного состояния, а также полученные данные о влиянии нокаута гена *insrr* на секрецию бикарбонатов в мочу, характеристика состояния самой паренхимы почки, а также популяций вставочных клеток собирательных трубок отсутствует.

Изменение pH оказывает влияние на множество типов клеток в том или ином органе. Это влияние может быть прямым или опосредованным. Одним из дифференоров, который реагирует на изменение pH выраженным образом, являются макрофаги. Эта особенность макрофагов используется для доставки лекарств с помощью наночастиц [Gouveia и др., 2019]. Предполагают, что изменение pH влияет на макрофаги благодаря функционированию NF-κB-сигнального пути [Gerry, Leake, 2014].

Известно, что pH среды оказывает выраженное влияние на органные метаболические и сигнальные пути. Показана роль рецептора IRR в активации сигнального пути субстрата инсулинового рецептора IRS-1 в островковых клетках поджелудочной железы [Deyev и др.,

2017]. В островковых клетках поджелудочной железы крысы рецептор IRR связан с активацией AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK), которая играет роль энергетического сенсора регуляции клеточного метаболизма и поддержании энергетического баланса [Raile и др., 2005]. Влияние рецептора IRR на перестройку актинового цитоскелета показана в клетках островков поджелудочной железы [Deuev и др., 2017], а также в клетках печени [Peng и др., 2023]. В исследованиях рецептора IRR при злокачественных новообразованиях указывают его роль как иммуномодулятора, регулирующего синтез интерферона- β , продукцию иммуноглобулина-A, активацию дендритных клеток и Т-лимфоцитов и модуляцию иммунного ответа в опухоли, а также рецептор вовлечен в регуляцию окислительного фосфорилирования [Peng и др., 2023; Zhang и др., 2023]. Однако такие данные, касающиеся функционирования рецептора IRR в почках, отсутствуют. На основании приведенных данных сформулированы цель и задачи исследования.

Цель исследования: изучить влияние инактивации гена *insrr* и кодируемого этим геном рецептора IRR на строение почки и профиль экспрессии генов в клетках этого органа в условиях физиологической нормы и при алкалозе у мыши.

Задачи исследования:

1. Дать морфологическую оценку состояния почки у мышей с инактивированным рецептором IRR в условиях физиологической нормы и при алкалозе.
2. Установить различия в численности α -и β - вставочных клеток собирательных трубок почек у двух генотипов мышей.
3. Идентифицировать популяцию макрофагов почки и сравнить количество данных клеток у животных двух генотипов в физиологических условиях и условиях алкалоза.
4. Определить гены с измененной экспрессией в паренхиме почек животных дикого типа и животных с инактивированным геном рецептора IRR в физиологических условиях и условиях алкалоза с помощью РНК-секвенирования.
5. Проанализировать изменения относительного уровня экспрессии генов в почечной паренхиме животных в норме и при инактивации гена IRR с помощью ПЦР в реальном времени для генов, показавших значимые изменения по результатам транскриптомного анализа.
6. Определить роль инактивации гена рецептора IRR на развитие преимплантационных эмбрионов мыши методом MEА-теста.

Диссертация соответствует паспортам научных специальностей 1.5.22. Клеточная биология, пунктам 6, 8, 22 и 1.5.3. Молекулярная биология, пункту 6.

Научная новизна

Проведен анализ влияния инактивации гена *insrr* у мышей C57Bl/6 на паренхиму почки: микроскопическая структура коркового и мозгового вещества, а также частей нефронов осталась типичной как для животных с нормальным генотипом, так и для нокаутных животных в различных условиях, включая моделирование алкалоза. Однако у животных с нокаутом по гену *insrr* толщина паренхимы, диаметр собирательных трубок и площадь почечных клубочков были меньше по сравнению с животными дикого типа при моделировании алкалоза. Количество CD86+ и CD206+ макрофагов, α -и β - вставочных клеток собирательных трубок почки в условиях нормы и при алкалозе не различалось между нокаутными животными и мышами дикого типа.

Установлено, что транскриптомы мышей с инактивированным геном *insrr* различаются как в нормальных условиях, так и при алкалозе с соответствующими транскриптомами мышей дикого типа. Инактивация гена *insrr* вызывает активацию генов сигнальных путей, связанных с энергетическим обменом, а именно с цепью переноса электронов, синтезом АТФ и транспортом электронов. Гены, участвующие в окислительном фосфорилировании и кодирующие рибосомальные белки, существенно активируются после нокаута IRR (напри-

мер, *ndufa1*, *mt-nd6*, *cox6b*, *atp6v1g3*), тогда как гены мембранных транспортеров были скорее подавлены (например, *slc26a4*, *slc16a1*, *slc5a2*). Это указывает на то, что сигнализация IRR участвует в энергоснабжении клеток. Результаты транскриптомного анализа впервые показали снижение экспрессии гена домашнего хозяйства *gapdh*, при инактивации гена *insrr*, что подтверждено, как и методом ПЦР в реальном времени, так и на белковом уровне клеток различных органов – почки, печени и головного мозга мыши. Инактивации рецептора IRR приводит к задержке развития, остановке и ассиметричному дроблению мышинных эмбрионов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в исследовании данные дают представление о малоизученной роли рецептора IRR в условиях моделирования алкалоза, его влиянии на морфологию почечной паренхимы, на популяцию макрофагов почки, на количество вставочных клеток нефрона. Практическая значимость работы заключается в описании новой модели, полученной с помощью нокаута гена *insrr* у мышей C57Bl/6, которая может быть использована в фундаментальных и доклинических исследованиях. Полученные данные по РНК-секвенированию паренхимы почек животных двух генотипов выявил повышение экспрессии генов путей энергетического обмена при инактивации гена IRR, что может быть в дальнейшем использовано для сравнения различных молекулярных механизмов при моделировании нарушений энергетического обмена. Описанная в работе модель животных с инактивированным геном *insrr* может служить основой фундаментальных и доклинических исследований обмена кислот и оснований в органах и биологических жидкостях, а также для изучения метаболического алкалоза и ацидоза.

Методология и методы исследования

В работе использовались перечень методов, позволяющих реализовать комплексный подход к исследованию участия IRR в регуляции кислотно-щелочного равновесия в почке мыши. При морфологическом анализе органов использовались как классические методы (окрашивание срезов гематоксилином и эозином), так и современные подходы – флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание маркеров вставочных клеток собирательных трубок почки, детекция макрофагов почки. Для оценки генетических механизмов использовались методы высокопроизводительного РНК-секвенирования тотальной паренхимы почки, ОТ-ПЦР в реальном времени, биоинформатический анализ, аннотирование генов с помощью инструмента Gene Ontology, статистическая обработка данных. Дополнительно использован метод выделения зигот из мыши и оценка развития эмбрионов на стадии дробления до бластоцисты.

Положения, выносимые на защиту

1. Нокаут по гену *insrr* не вызывает выраженного нарушения гистологического строения почек, при этом моделирование алкалоза приводит к компенсаторным изменениям в паренхиме почек как нокаутных животных, так и животных дикого типа.
2. Инактивация гена рецептора IRR не влияет на состояние популяция CD86+ и CD206+ макрофагов почки, а также на количество α -и β вставочных клеток собирательных трубок.
3. Анализ экспрессии генов с помощью РНК-секвенирования выявил, что нокаут гена *insrr* приводит активации сигнальных путей, регулирующих энергетический обмен в клетке, а именно связанных с цепью переноса электронов, синтезом АТФ, транспортом электронов. У мышей дикого типа потребление бикарбоната натрия приводило к изменению активности транспортеров, инактивация *insrr* вызывает изменения на молекулярном уровне, сравнимые с таковыми при бикарбонатной нагрузке.

Личный вклад соискателя заключается в планировании и проведении экспериментов, статистической обработке данных, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов обоснована достаточным количеством экспериментальных групп и объемом данных для каждой из них, воспроизводимостью результатов, использованием современных методов исследования, корректным применением статистических методов, критическим анализом результатов исследования и сопоставлении их с актуальными литературными данными.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа описана на 124 страницах текста и включает 30 рисунков и 9 таблиц. Структура работы состоит из Введения, трех глав («Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение»), Заключение, Выводов, Списка литературы и Дополнительных материалов. Список литературы содержит информацию о 211 источниках.

Апробация результатов исследования

Материалы диссертации были представлены на Зимней Международной Молодежной Научной Школе "Перспективные Направления Физико-химической Биологии и Биотехнологии" (Москва, 2022 и 2021 гг.), на Конференции молодых ученых "Актуальные проблемы биологии развития" (Москва, 2021), на VII Молодежной Школе-конференции ИНЦ РАН (Санкт-Петербург, 2022 и 2020 гг.), а также на Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века" (Пущино, 2020).

Публикации

По материалам диссертации сделано 12 работ, из них опубликовано 5 статей в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, одна научная статья в печати на стадии публикации, а также 6 материалов конференций.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

В эксперимент брали самок мышей возрастом 3–4 месяца линии C57Bl/6 и нокаутных животных по гену *insrr* строго потомков первого поколения, литтермейтсов [Holmdahl, Malissen, 2012]. Основная линия мышей содержится в питомнике филиала ИБХ в г. Пущино, Московская область. Эксперименты над животными проведены в соответствии с рекомендациями ARRIVE Guidelines [Percie Du Sert и др., 2020]. Материалы исследования одобрены Локальным этическим комитетом ФГБНУ РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского в соответствии с Выпиской из Протокола заседания №8 от 29 сентября 2023г.

Гистологические методы: почки фиксировали 10% нейтральном формалине, после стандартной гистологической проводки заливали в парафин, далее готовили серийные гистологические срезы толщиной 5–6 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимический метод: использовали тройное иммунофлуоресцентное окрашивание срезов со следующими маркерами – AE1 для α -вставочных клеток (Cell Signaling Technology, USA), Pendrin для β -вставочных клеток (Cell Signaling Technology, USA), SubE H+ATPase для интеркалирующих клеток (Cell Signaling Technology, USA) и соответствующими вторичными антителами (козы анти-кроличьи Alexa555 (1:2000), ослиные анти-морской свинки Cy5 (1:500), козы анти-куриные Alexa488 (1:800) (Invitrogen, USA) и ядра докрашивали DAPI (1:1000) (Invitrogen, USA). Макрофаги выявляли с помощью антител к CD86 (Abcam, UK) и CD206 (Abcam, UK) со вторичными анти-кроличьими антителами, конъюгированными с FITC (1:100) и ядра докрашивали DAPI (Invitrogen, USA). Количество положительно окрашенных клеток вычисляли в 10 случайных полях зрения, далее определяли долю положительно окрашенных клеток как отношения их числа к общему числу клеток в поле зрения.

Морфометрические методы: подсчет различных типов вставочных клеток, определение площади почечного тельца, толщины коркового и мозгового вещества с помощью программы Image Scope M (СМА, Россия).

Анализ транскриптома: для секвенирования РНК из среднего среза по горизонтальной плоскости вырезали сегмент почки толщиной 3 мм и помещали в буфер RNAlater. Все очистки РНК и анализ РНК-секвенирования были выполнены компанией ЗАО «Геноаналитика» (Москва, Россия). Секвенирование проводили на HiSeq1500 с длиной считывания 50 п.н. Для каждого образца было сгенерировано не менее 20 миллионов прочтений.

Биоинформатический анализ: прочтения были картированы на геном с помощью Star Aligner, а кратные изменения были рассчитаны с использованием программного обеспечения DEseq2.0. Первичные данные секвенирования РНК были депонированы в Европейский архив нуклеотидов под номером GSE200638 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE200638>). Анализ главных компонент (PCA) проводился на основе матрицы CPM (прочтений на миллион), экспортированной из EdgeR. Для анализа функционального обогащения и анализа сети взвешенной коэкспрессии генов (WGCNA) данные РНК-секвенирования были обработаны выборочным выравниванием salmon на референсный геном мыши.

Подтверждение данных транскриптомного анализа: количественную TaqMan ПЦР в реальном времени проводили с использованием образцов кДНК почек мыши в качестве мат-

рицы. Праймеры и зонд для специфического отжига для каждого гена были выбраны с использованием инструментов Gene-Runner, OligoExplorer и Oligo Analyser. Зонды содержали флуоресцентную метку FAM (амидиты флуоресцеина) на 5'-конце и тушитель BHQ1 (Black Hole Quencher 1) на 3'-конце.

Физиологический тест: проведен глюкозотолерантный тест для мышей двух генотипов, с инактивацией гена рецептора IRR и дикого типа, в нормальных условиях. Измеряли глюкозу в крови с помощью тест-полосок (Diacont-1, Китай) и глюкометра (OneTouch Select Simple, Швейцария) натощак и после внутрибрюшинной инъекции глюкозы.

Статистическая обработка данных: результаты представлены с использованием средних значений и стандартных отклонений (или стандартных ошибок среднего), либо медиан и перцентилей. Для проверки распределения данных на нормальность, для сравнения выборочных долей был использован тест Шапиро-Уилка. При нормальном распределении данных проводились парные сравнения с использованием t-теста. В случае распределения, отличного от нормального, парные сравнения осуществлялись с использованием теста Манна-Уитни. Для множественных сравнений при нормальном распределении данных применялся однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с post-hoc критерием Holm-Sidak, а при распределении, отличном от нормального, использовался ранговый дисперсионный анализ (ANOVA on ranks) с post-hoc критерием Дана. Статистическая значимость различий была установлена на уровне 5%. Для анализа данных использовалась программа Prism 8 (GraphPad США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подтверждение нокаута по гену *insrr*, моделирование алкалоза

Во всех экспериментах, описанных в данной работе, использовали строго мышей одного поколения, самок одного возраста (3–4 месяца). При получении потомства первого поколения гетерозигот образцы ткани отправляли на генотипирование. Генотип подтверждали методом ПЦР с геномной ДНК мышей для определения наличия нокаутного аллеля или аллеля дикого типа. Определен генотип 191 мыши. Из них было 47 гомозиготных мышей дикого типа, 55 гомозиготных мышей с нокаутом и 89 гетерозигот. Мышей дикого типа и нокаутных мышей *insrr* содержали в двух условиях. В обычных условиях мышей поили водой. В условиях щелочной нагрузки в питьевую воду добавляли 280 мМ бикарбоната натрия в течение 7 дней [Ferdous и др., 2023], что вызывает метаболический алкалоз.

Гистологическое строение почек

Исследование гистологических срезов почек показало, что паренхима почек животных дикого типа, как в нормальных условиях, так и при моделировании алкалоза была разделена на корковое и мозговое вещество. В корковом веществе обнаруживали почечные тельца, окруженные проксимальными и дистальными извитыми канальцами. Почечные тельца были структурированы, полость капсулы хорошо заметна. Стенка проксимальных извитых канальцев образована однослойным кубическим эпителием с хорошо выраженной щеточной каемкой, просвет проксимальных канальцев узкий. Стенка дистальных извитых канальцев образована однослойным кубическим эпителием, щеточная каемка отсутствовала, просвет хорошо контурирован. Мозговое вещество почек было представлено в основном собирательными трубками и тонкими канальцами. Собирательные трубки с выраженным просветом, стенка образована высоким призматическим эпителием. Тонкие канальца имели четкие контуры, стенка образована плоскими эпителиоцитами. На гистологических срезах почек нокаутных животных, как в условиях нормы, так и при моделировании алкалоза наблюдали стро-

ение типичной паренхимы почек. Таким образом, можно сделать вывод, что нокаут гена *insrr* не приводил к какому-либо патологическому нарушению строения почек.

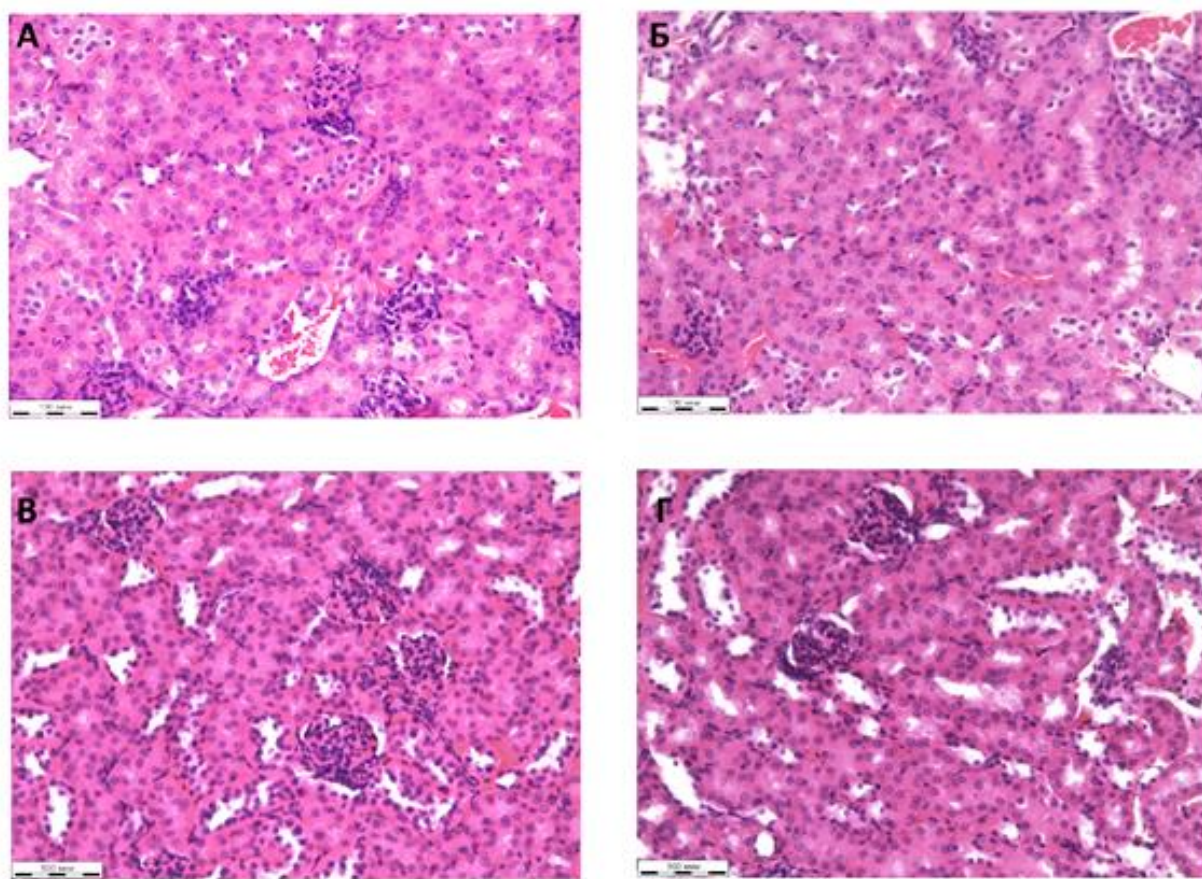


Рисунок 1 – Окрашивание почек гематоксилин-эозин, увеличение 20х. А – животные дикого типа в нормальных условиях, Б – животные дикого типа в условиях бикарбонатной нагрузки, В – нокаутные животные (IRR $-/-$) в нормальных условиях, Г – нокаутные животные (IRR $-/-$) в условиях бикарбонатной нагрузки. Масштабная линейка – 100 мкм.

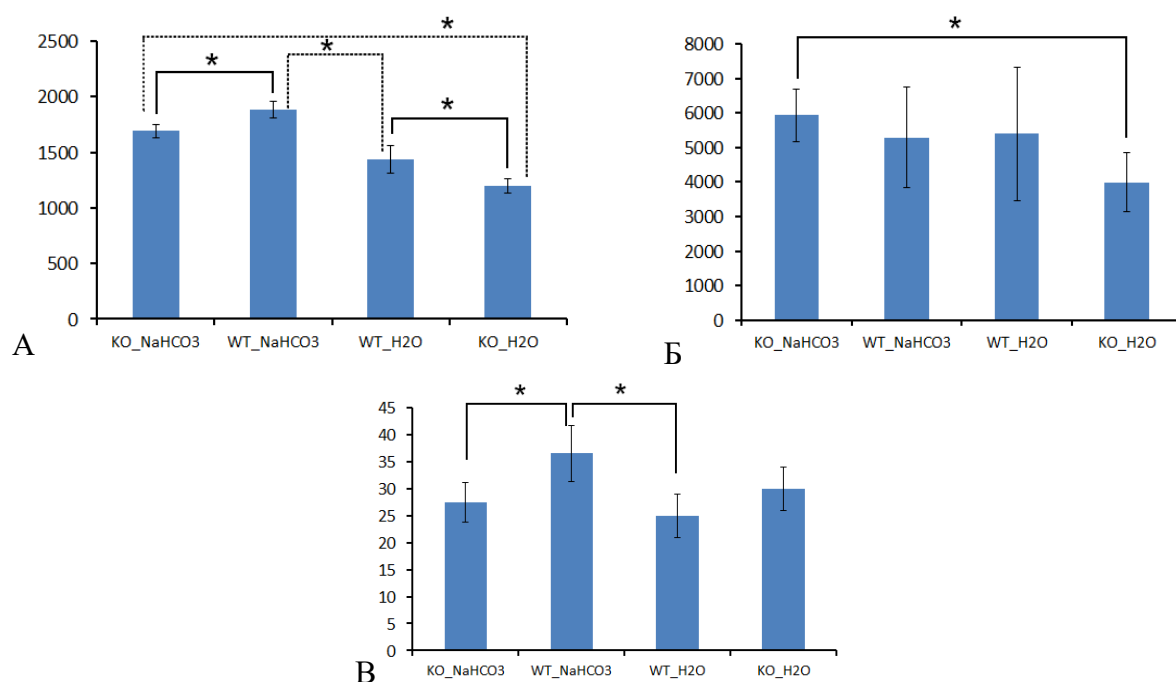


Рисунок 2 – Морфометрическая характеристика почек. А – толщина паренхимы, мкм, Б – площадь почечного тельца, мкм², В диаметр собирательных трубок, мкм. Данные представлены как среднее±стандартное отклонение, КО – животные с нокаутом гена *insrr*, WT – животные дикого типа, * - статистически значимые различия, $p < 0,05$.

При морфометрической оценке поперечных срезов почек на уровне почечной лоханки, окрашенных гематоксилин-эозином, были обнаружены различия в толщине паренхимы, а также площади почечного тельца и диаметра собирательной трубки. Установлено уменьшение толщины паренхимы у нокаутных мышей КО (IRR $-/-$) в условиях нормального питьевого режима. При этом в условиях моделирования алкалоза происходит увеличение толщины паренхимы как у нокаутных животных, так и у животных дикого типа. Нокаут гена *insrr* не приводил к изменению площади почечного тельца. При этом моделирование алкалоза у нокаутных животных приводило к значимому увеличению площади почечного тельца. Сходные данные были получены и при изучении диаметра собирательных трубок. Увеличение pH питьевой воды приводило к увеличению диаметра собирательных трубок у животных дикого типа, при этом диаметр собирательных трубок почки животных дикого типа был значимо больше, чем диаметр собирательных трубок в почках нокаутных животных в условиях алкалоза.

Количество вставочных клеток

Снижение экспрессии пендрина и нарушение секреции бикарбоната с мочой могут быть связаны с изменением количества или соотношения вставочных клеток у животных с нокаутом *insrr*. Разные факторы могут влиять на это соотношение [Bagnis и др., 2001], например, у мышей с нокаутом AE1-R607H наблюдается сниженное количество α -вставочных клеток [Деев и др., 2006]. Чтобы проверить эту возможность, произвели подсчет вставочных клеток в почках мышей дикого типа и мышей с нокаутом *insrr* в нормальных и щелочных условиях нагрузки. Для подсчета количества вставочных клеток собирательных трубок почки провели тройное иммунофлуоресцентное окрашивание срезов почек [Cornière, Eladari, 2020] на маркерные белки α - и β -вставочных клеток - AE1, пендрин и E-субъединицу АТФазы V-типа (рис. 3 А-Г). AE1 является маркером α -вставочных клеток, которые имеют АТФазу V-типа на апикальной мембране и анионообменник (AE1) на базолатеральной мем-

бране. Пендрин-положительные β -вставочные клетки характеризуются апикальной экспрессией пендрина и базолатеральной экспрессией АТФазы V-типа. Количество α - и β -вставочных клеток в почках мышей с нокаутом *insrr* не менялось. Также мы не наблюдали каких-либо изменений числа вставочных клеток при щелочной нагрузке у мышей обоих генотипов (рис. Д-Е).

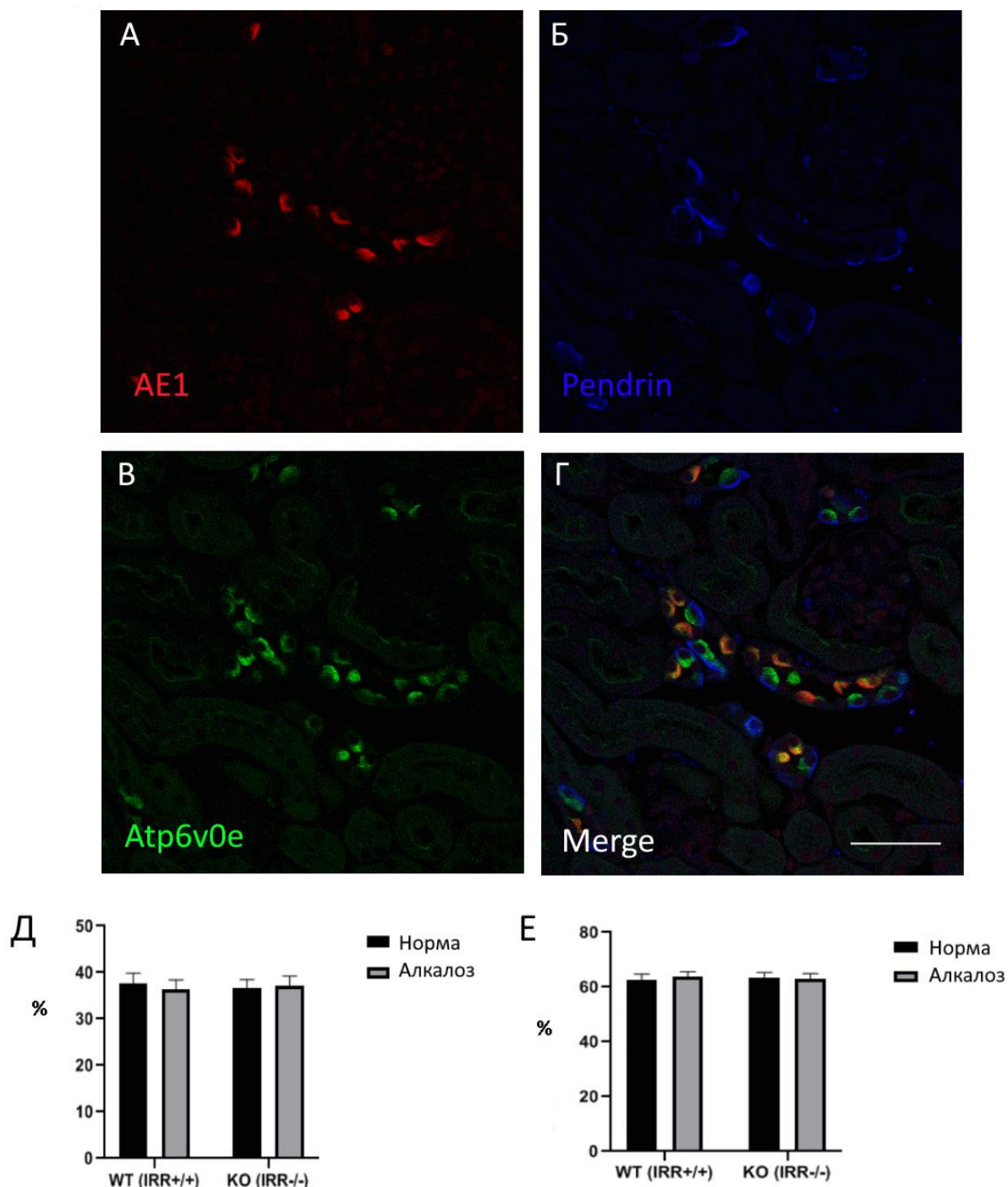


Рисунок 3 – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание срезов почек, антипендрин, конъюгированный с Alexa Fluor 555 (А), анти-AE1, конъюгированный с Cy5 (Б), анти-Е-субъединица Н⁺-АТФазы, конъюгированная с Alexa Fluor 488 (В), слияние (Г). Количественное определение AE1-положительных (Д) и пендрин-положительных (Е) и вставочных клеток. WT – животные дикого типа, KO – нокаутные животные. Увеличение $\times 20$, масштабная линейка – 50 мкм

Популяция макрофагов почек.

Активность макрофагов определяется множеством факторов [Chen и др., 2023]. В настоящее время установлено, что рН является одним из механизмов, посредством которого определяется про- или противовоспалительное состояние макрофагов [Wu и др., 2019]. Популяцию макрофагов почек изучали с помощью определения маркерного белка провоспалительных макрофагов – CD86, а также маркерного белка противовоспалительного макрофага – CD206.

Макрофаги, экспрессирующие указанные маркеры, распределены неравномерно между корковым и мозговым веществом. Макрофаги, положительные по CD86 ассоциированы в основном только с почечными тельцами, внутри которых они образовывали сложную сеть, что затрудняло их количественную оценку.

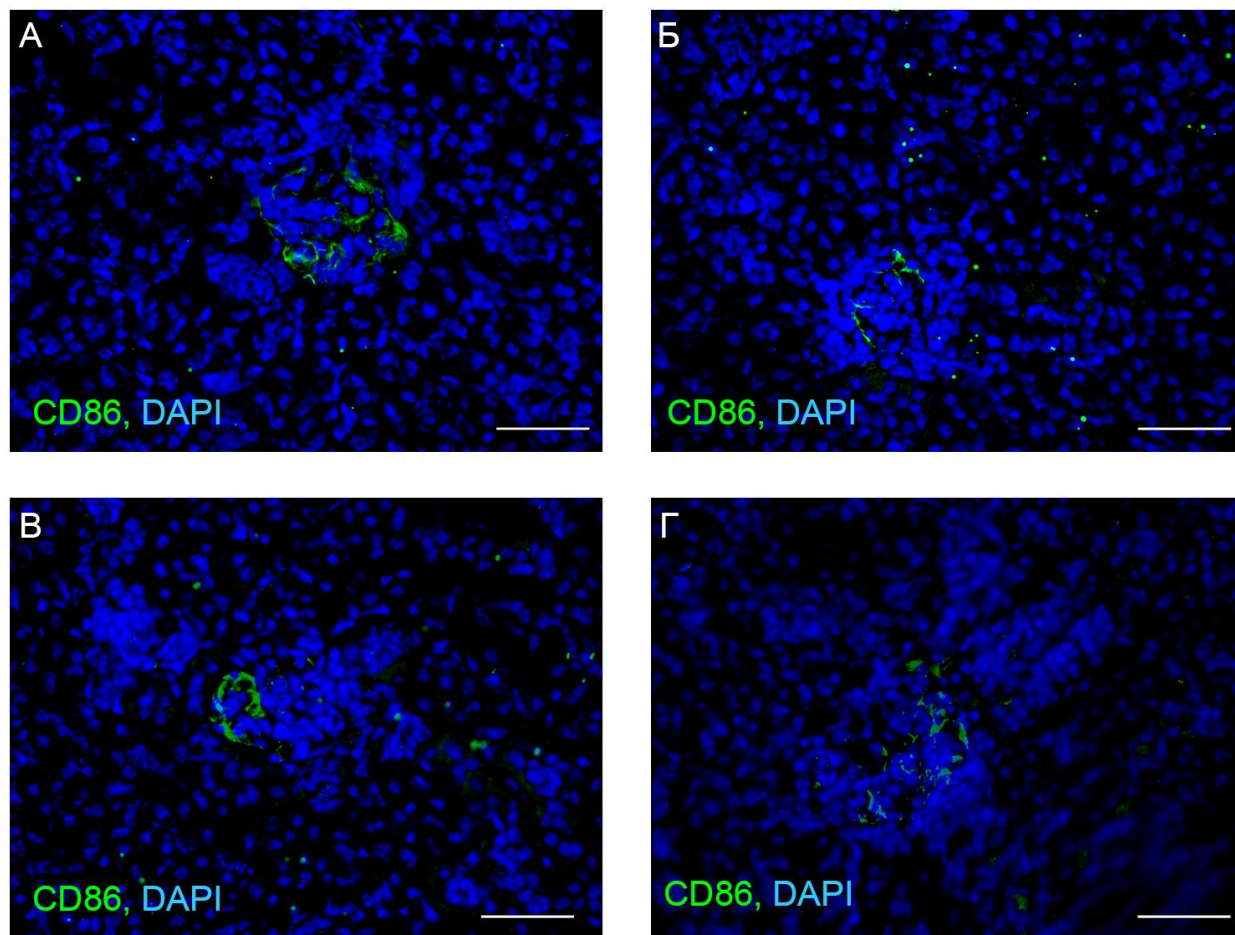


Рисунок 4 – Иммуногистохимическое исследование маркера макрофагов CD86. А – животные дикого типа (IRR+/+) в нормальных условиях, Б – животные дикого типа (IRR+/+) в условиях бикарбонатной нагрузки, В – нокаутные животные (IRR –/–) в нормальных условиях, Г – нокаутные животные (IRR –/–) в условиях бикарбонатной нагрузки. Зеленое свечение – FITC, ядра докрашены DAPI (синее свечение). Увеличение $\times 20$, масштабная линейка – 50 мкм

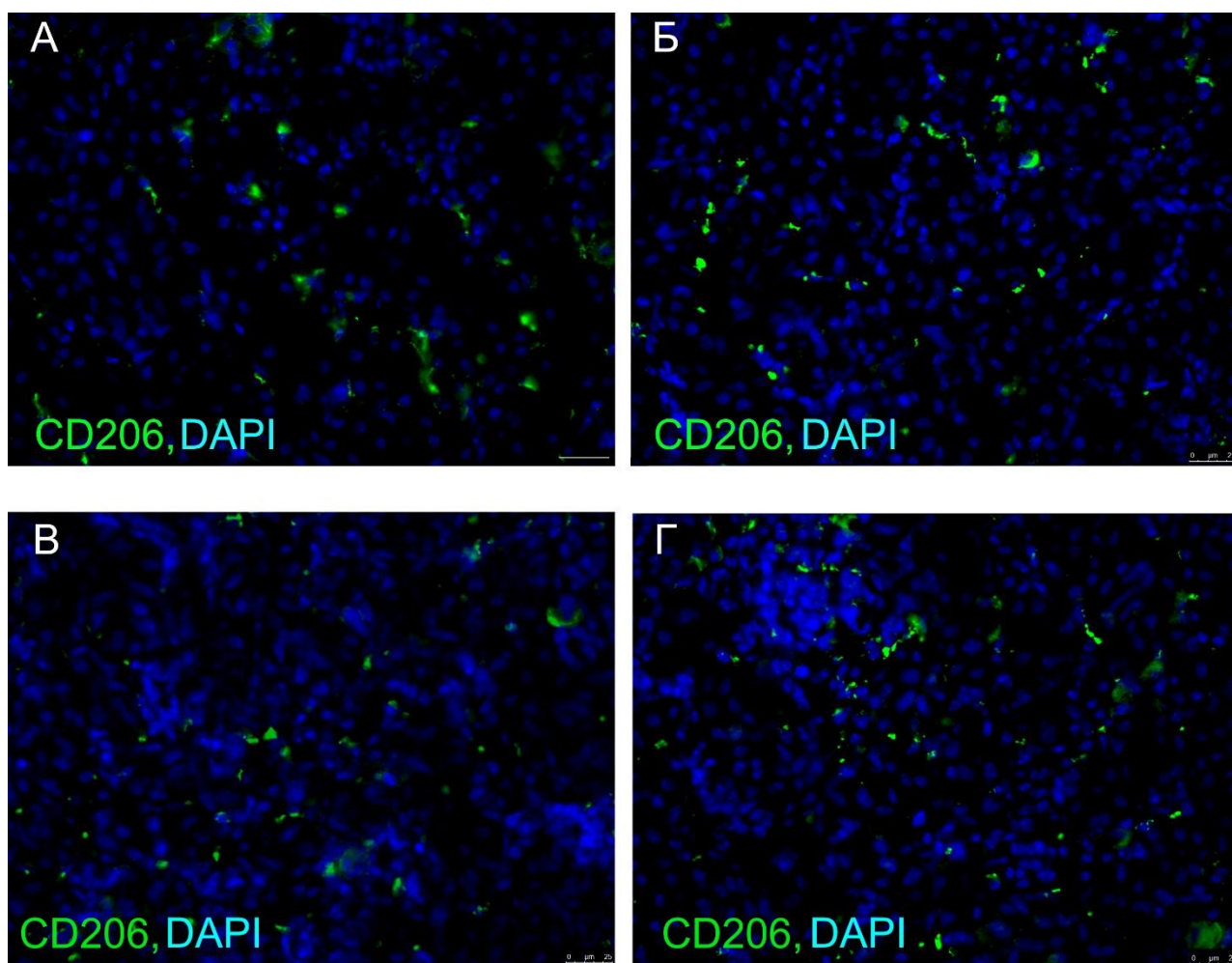


Рисунок 5 – Иммуногистохимическое исследование маркера макрофагов CD206. А – животные дикого типа (IRR+/+) в нормальных условиях, Б – животные дикого типа (IRR+/+) в условиях бикарбонатной нагрузки, В – нокаутные животные (IRR -/-) в нормальных условиях, Г – нокаутные животные (IRR -/-) в условиях бикарбонатной нагрузки. Зеленое свечение – FITC, ядра докрашены DAPI (синее свечение). Увеличение $\times 20$, масштабная линейка – 50 мкм.

CD206+макрофаги встречались как в корковом, так и в мозговом веществе. При этом как в корковом, так и мозговом веществе данный тип макрофагов ассоциирован со стенкой канальцев (Рис.5), в корковом веществе CD206+макрофаги также обнаруживались в почечном тельце. Количественная оценка CD206+макрофагов, ассоциированных с почечными канальцами, не выявила статистически значимых различий между почками животных дикого типа и нокаутными животными, как в нормальных условиях, так и при моделировании алкалоза (Рис.6).

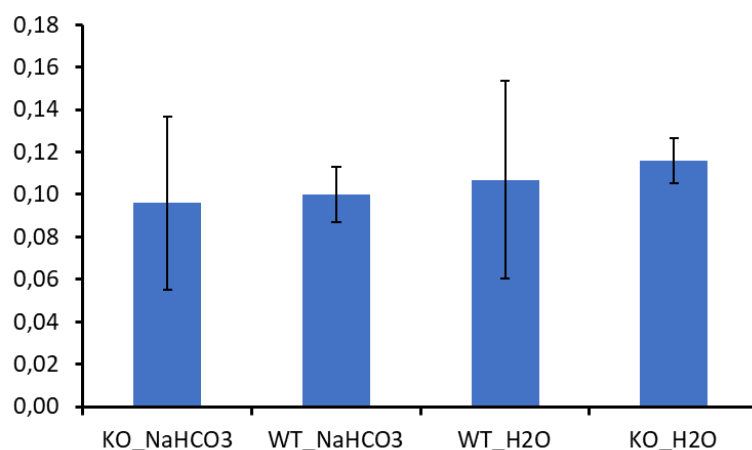


Рисунок 6 – Количество CD206 макрофагов в почке нокаутных животных и животных дикого типа по данным иммуногистохимического исследования, доля от общего количества клеток. WT (IRR+/+) – почки животных дикого типа, KO (IRR –/–) – почки нокаутных животных, представлены средние значения±стандартное отклонение.

Анализ транскриптома почки

Проведен сравнительный анализ транскриптомов почек мышей WT и *insrr* KO с использованием RNAseq. Таким образом, были получены четыре группы данных: дикий тип (WT) в физиологических условиях, WT в условиях щелочной нагрузки, *insrr*-нокаут (KO) в физиологических условиях и бикарбонатная нагрузка. В каждую группу входило по 4 мыши. В нормальных условиях у мышей KO наблюдалось 2316 дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ)[Robinson, McCarthy, Smyth, 2010] по сравнению с диким типом, включая 1348 повышенных и 968 пониженных ДЭГ (рис. 7А). После нагрузки бикарбонатом экспрессия 2879 генов значительно изменилась у мышей с нокаутом *insrr* по сравнению с диким типом: 1504 повышенных и 1375 пониженных ДЭГ. Сравнивая мышей одного и того же генотипа после нагрузки бикарбонатом или в физиологических условиях, мы обнаружили 136 DEG у мышей дикого типа (39 с повышенной регуляцией и 97 с пониженной регуляцией) и 157 DEG (35 с повышенной регуляцией и 122 с пониженной регуляцией) у мышей *insrr* KO (рис. 7А). Общую структуру набора данных RNA-seq оценивали с помощью анализа главных компонентов (PCA) (рис. 7Б). Как показано на графике компонентов PCA, данные РНК-секвенирования групп мышей дикого типа и мышей с нокаутом *insrr* достоверно отличались друг от друга [Son и др., 2018].

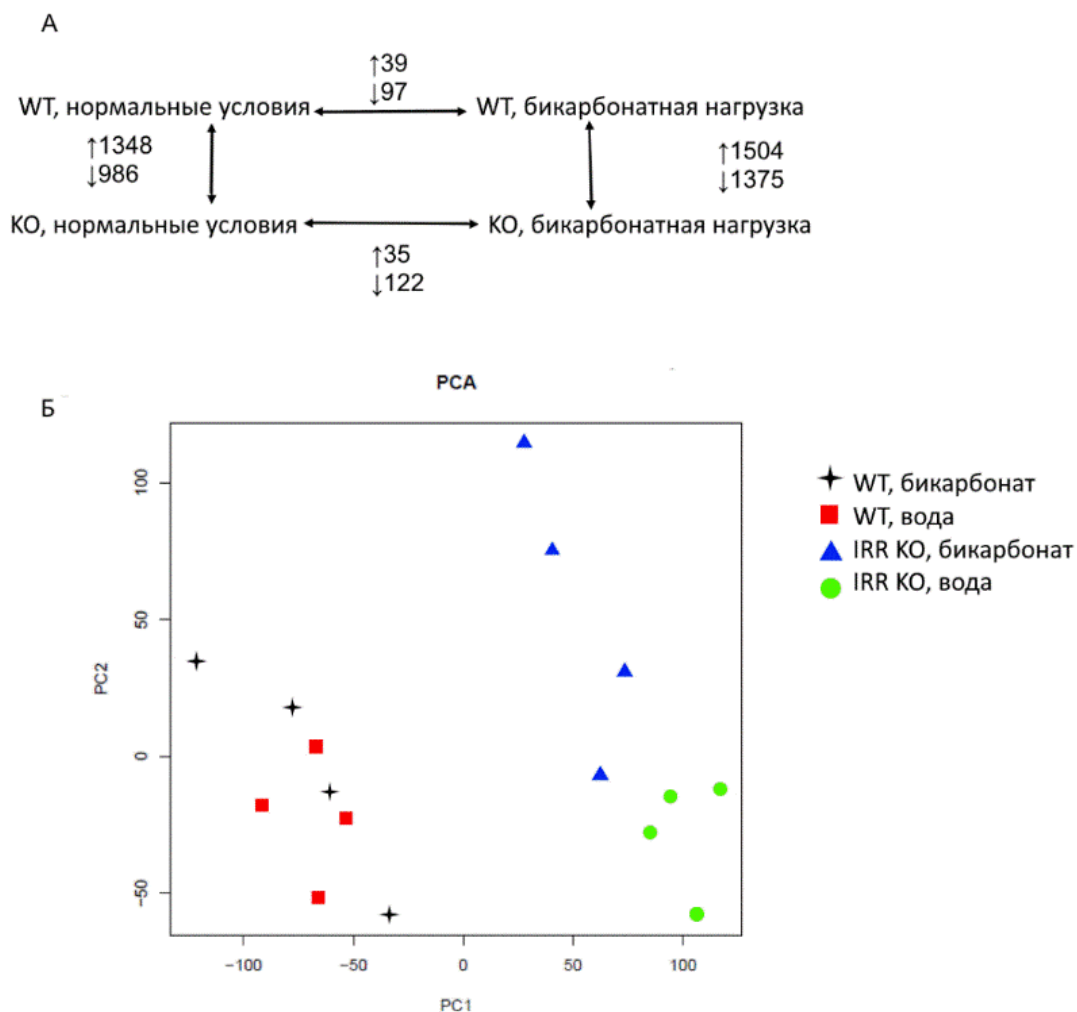
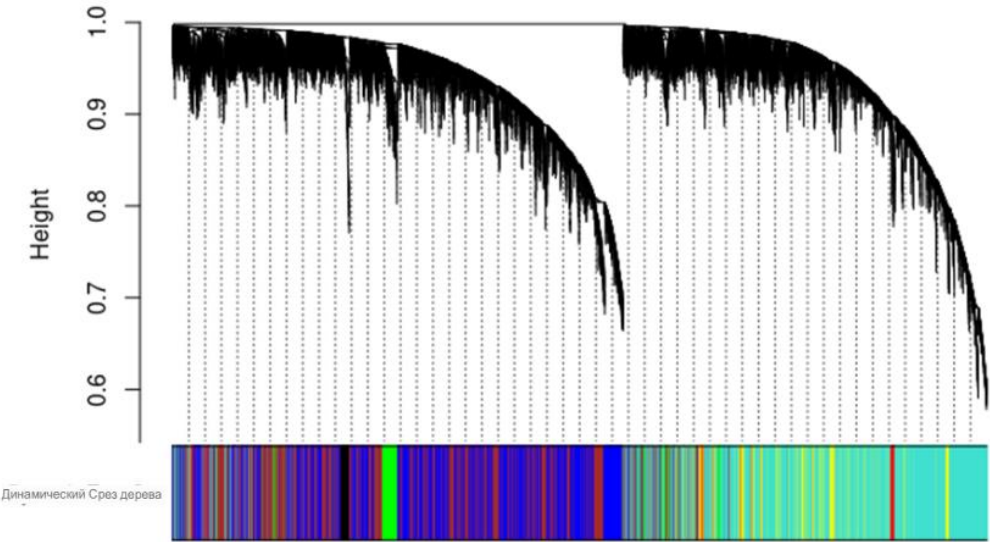


Рисунок 7 – А – Количество дифференциально экспрессируемых генов; Б – PCA образцов на основе матрицы RPKM;

Анализ быстрого обогащения набора генов Gene Ontology (GO fgsea)[Carbon и др., 2021], основанный на логарифмическом изменении (logFC) между образцами с нокаутом *insrr* и образцами дикого типа в нормальных условиях, выявил, что нокаут вызывает изменения в экспрессии генов, связанных с цепью переноса электронов, синтезом АТФ, синтезом белка. Гены, участвующие в окислительном фосфорилировании, и рибосомальные белки существенно активируются после нокаута *insrr*, в то время как гены, связанные с несколькими трансмембранными сигнальными путями, по-видимому, подавляются.

На рис. 8 приведен анализ WGCNA [Langfelder, Horvath, 2008], который выявил семь модулей генов. Для собственных генов каждого из модулей использовали линейную модель с тремя независимыми переменными: генотипом, условием и их взаимодействием. На рис. 8 показано, количество генов и их соответствие группам выборок. Первые три модуля (бирюзовый, синий и коричневый) значимо коррелируют с нокаутом *insrr* ($p < 0,05$, линейная регрессия с поправкой Бонферрони на количество модулей). Коричневый модуль также демонстрирует относительно значимую зависимость от взаимодействия нокаута и бикарбонатной нагрузки ($p = 0,03$ без коррекции). Из генов бирюзового, синего и коричневого модулей мы выбрали DEG (QL F-тест FDR < 5%, либо при бикарбонатной нагрузке, либо в нормальных

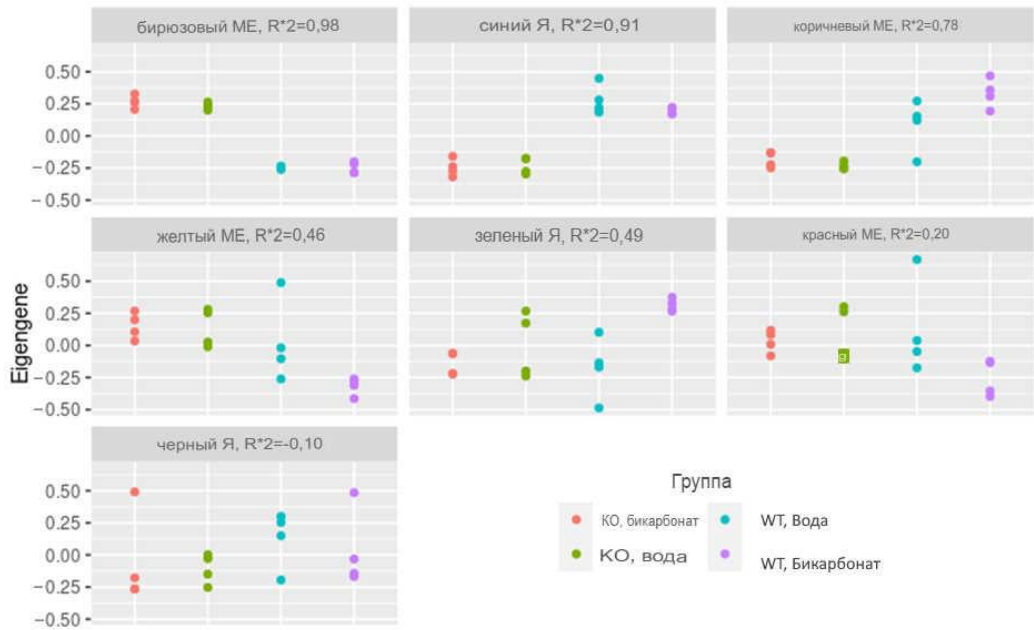
условиях), которые наиболее коррелировали с собственными генами модуля (коэффициент корреляции Пирсона $> 0,8$). Мы выполнили GO-анализ сверхпредставленности генов в полученных списках. Бирюзовый модуль, который соответствует генам, активированным у мышей с нокаутом, тесно связан с окислительным фосфорилированием. Напротив, синий модуль, гены которого активируются у дикого типа, связаны со многими другими биологическими процессами, такими как биогенез рибосом, процессинг некодирующих РНК, структура митохондрий и фолдинг белков.



А

Модуль	бирюзовый	синий	коричневый	желтый	зеленый	красный	черный
N генов	4726	3774	3136	916	434	261	183

Б



В

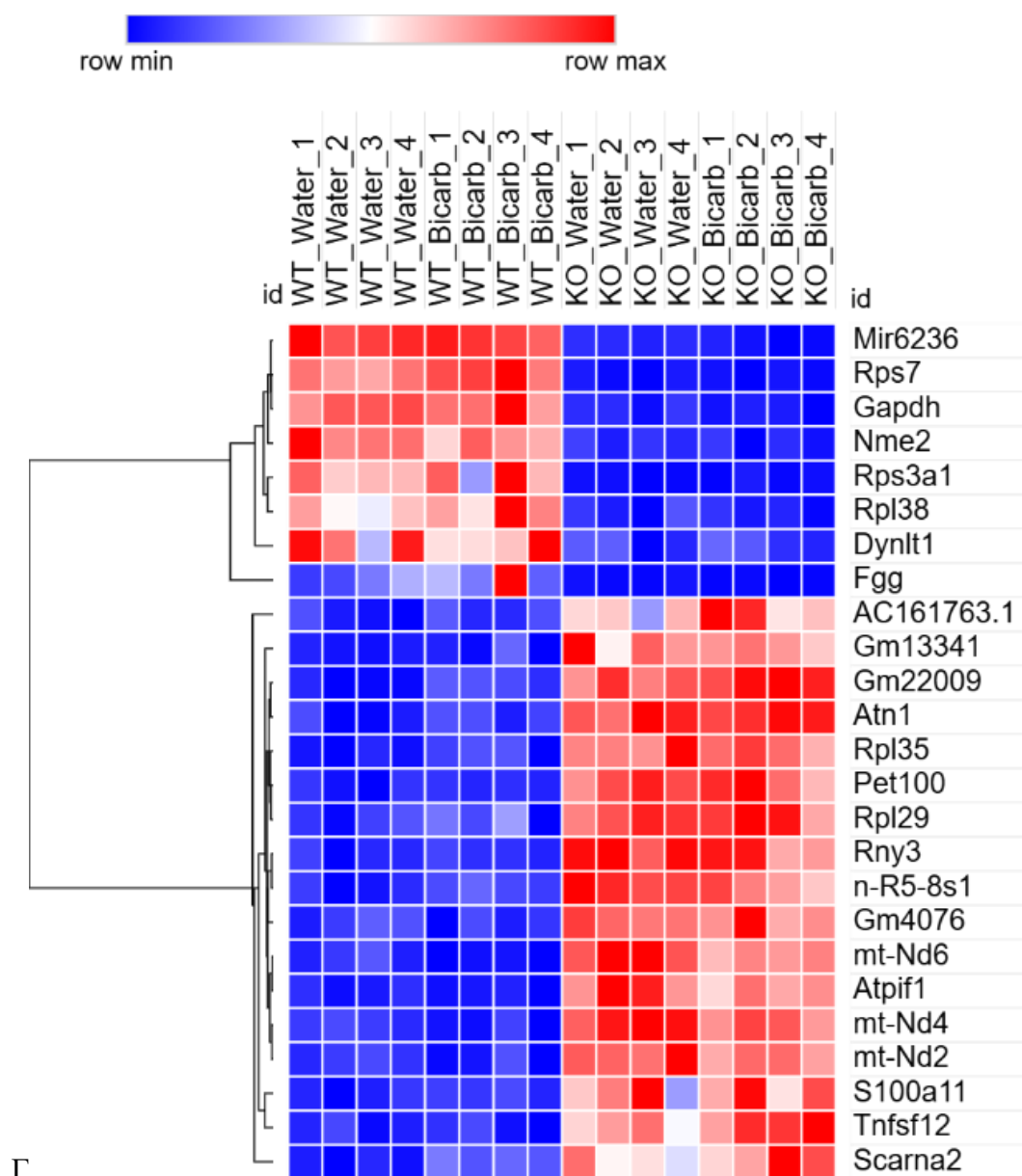


Рисунок 8 – А – дендрограмма WGCNA и цвета модулей; Б – размер генных модулей WGCNA; В – WGCNA значения генов по группам, с R2 линейной модели со следующими независимыми переменными: генотип (КО или WT), условия (бикарбонат или вода); Г – heatmap топ-25 генов, экспрессирующихся при нокауте IRR

Для подтверждения данных мы проверили экспрессию некоторых генов с помощью TaqMan ПЦР в реальном времени. Классический ген домашнего хозяйства *gapdh*, а также другой распространенный ген домашнего хозяйства, *rps7*, не подходили в качестве генов сравнения. По данным NGS, они сильно меняют свою экспрессию у мышей, нокаутных по *insrr*. Снижение экспрессии гена *gapdh* в почках мышей также было подтверждено с помощью TaqMan ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга. Используя литературные данные для поиска эталонных генов, мы выбрали *ap3d1* и *csnk2a2*[Hildyard, Finch, Wells, 2019]. По данным NGS, их экспрессия не менялась у животных двух генотипов в разных условиях. Ген *ap3d1* показал более высокий уровень экспрессии и был выбран в качестве основного эталонного гена для расчета данных ПЦР в реальном времени. Для ПЦР-анализа в реальном времени мы выбрали гены, связанные преимущественно с метаболическими процессами и ионным транспортом. Значительные изменения в экспрессии наблюдались для всех выбранных генов (*slc26a4*, *rps7*, *slc5a2*, *aqp6*, *plcd1*, *rny3*, *kcnk5*, *slc6a6*, *atp6v1g3*) (рис. 9). У мышей с

нокаутом *insrr* в нормальных условиях наблюдалась повышенная экспрессия некоторых генов, таких как *rny3*, *kcnk5*, *slc6a6*, *atp6v1g3*. Некоторые из них (*rny3*, *kcnk5*, *slc6a6*) также значительно увеличили экспрессию после бикарбонатной. Снижение экспрессии у животных с нокаутом *insrr* наблюдалось для *slc26a4*, *rps7*, *slc5a2*, *plcd1*, *aqp6*. Из них *slc26a4*, *slc5a2* снижали экспрессию у мышей, нокаутных по *insrr*, при нагрузке бикарбонатом.

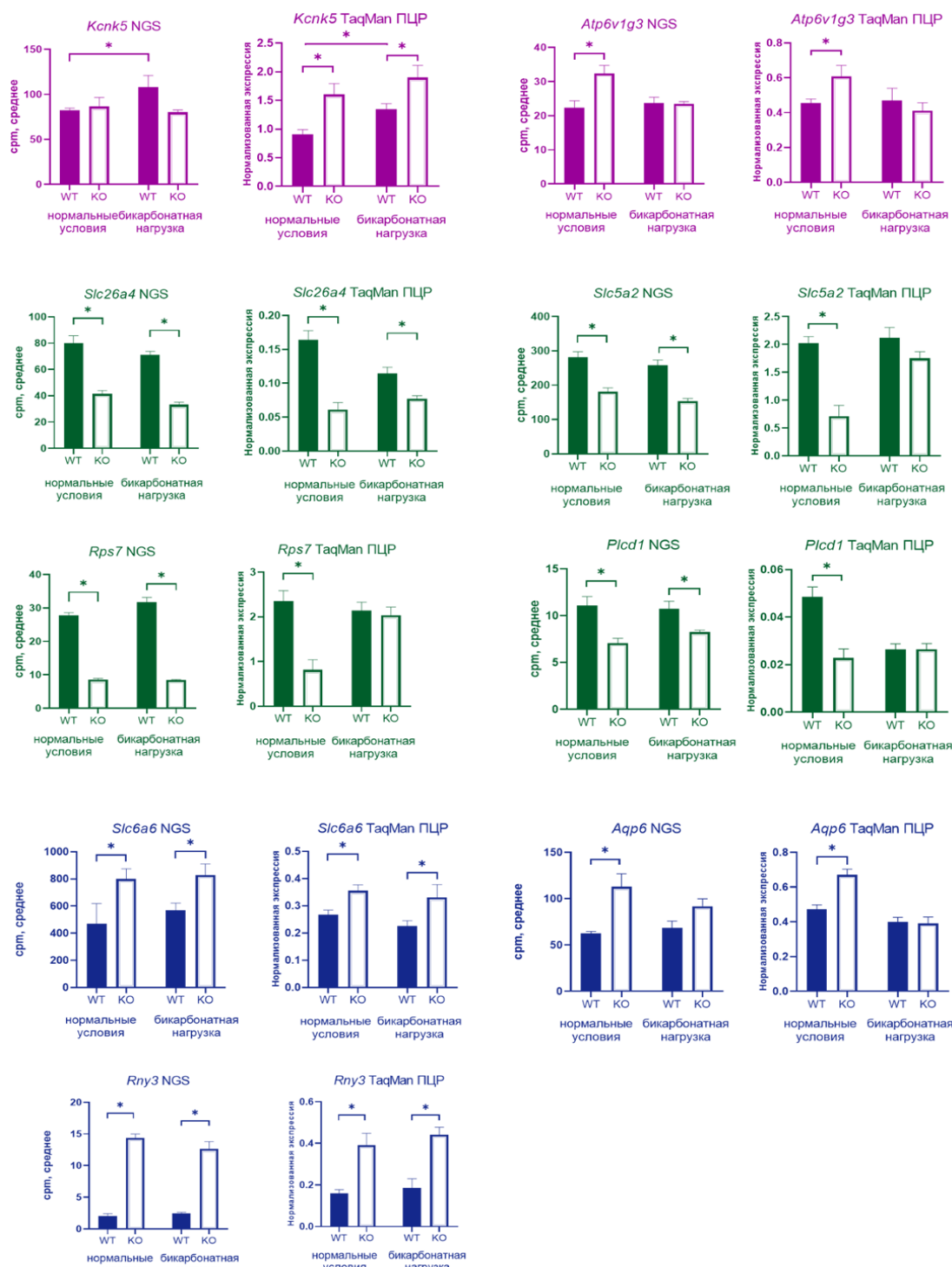


Рисунок 9 – Сравнение данных NGS и TaqMan PCR. Розовые столбцы — гены, которые меняют свою экспрессию после нагрузки бикарбонатом (чувствительны к изменению pH), зеленые столбцы — гены, экспрессия которых снизилась после инактивации *insrr*, синие столбцы — гены, экспрессия которых увеличилась после инактивации *insrr*.

Изменение экспрессии гена *slc5a2*, который кодирует глюкозно-натриевый котранспортер 2 (SGLT2) стало объектом нашего интереса, так как известно, что ингибиторы этого транспортера применяются при сахарном диабете 2 типа [Вопога, Avogaro, Fadini, 2020], так возникло предположение, что у нокаутных по гену *insrr* животных может быть нарушен транспорт глюкозы. Проведен глюкозотолерантный тест для мышей двух генотипов, который подтвердил данное предположение. Измеряли глюкозу в крови с помощью глюкометра, натощак и после внутрибрюшинной инъекции глюкозы. Результаты отображены на рис. 10. Нокаутные животные показали общее повышение глюкозы в промежуточных и конечной точках измерения, достоверно отличалась средняя площадь под кривой для двух генотипов.

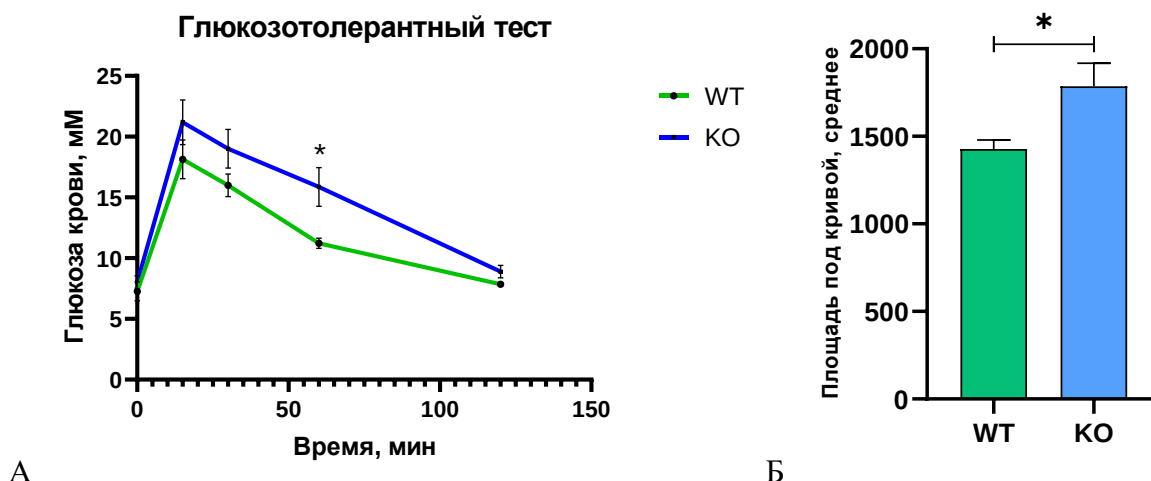


Рисунок 10 – Глюкозотолерантный тест мышей, нокаутных по гену *insrr* (KO) и животных дикого типа (WT) А – кривые динамики колебаний глюкозы в крови у животных двух генотипов Б – сравнение площади под кривой для двух генотипов.

В подтверждении достоверности изменений в процессах энергетического обмена у нокаутных животных провели анализ экспрессии гена домашнего хозяйства *gapdh* в почках мышей (рис. 11). При нокауте гена *insrr* наблюдаем значительное снижение экспрессии по данным, полученным в результате РНК-секвенирования. Это снижение характерно и для образцов кДНК из почек нокаутных животных в нормальных условиях. Стоит отметить уменьшение уровня экспрессии *gapdh* у животных дикого типа в условиях экспериментального алкалоза, по сравнению с животными дикого типа при нормальных условиях по данным ПЦР в реальном времени. Такое сильное изменение экспрессии гена *gapdh* заинтересовало, был проведен анализ экспрессии этого гена в различных органах мышей двух генотипов. Далее мы провели исследования образцов кДНК из печени и мозга мыши методом TaqMan ПЦР в реальном времени, чтобы понять, характерно ли снижение экспрессии гена *gapdh*, наблюдаемое в почках, для других органов. Результаты показаны на рис. 11, где видно, что снижение экспрессии гена *gapdh* у нокаутных по *insrr* животных характерно также для печени (рис. 11А) и мозга (рис. 11Б), все изменения статистически значимы ($p < 0.01$). Для печени и мозга показано снижение экспрессии гена *gapdh* на 30.5 % и 13.7 % соответственно.

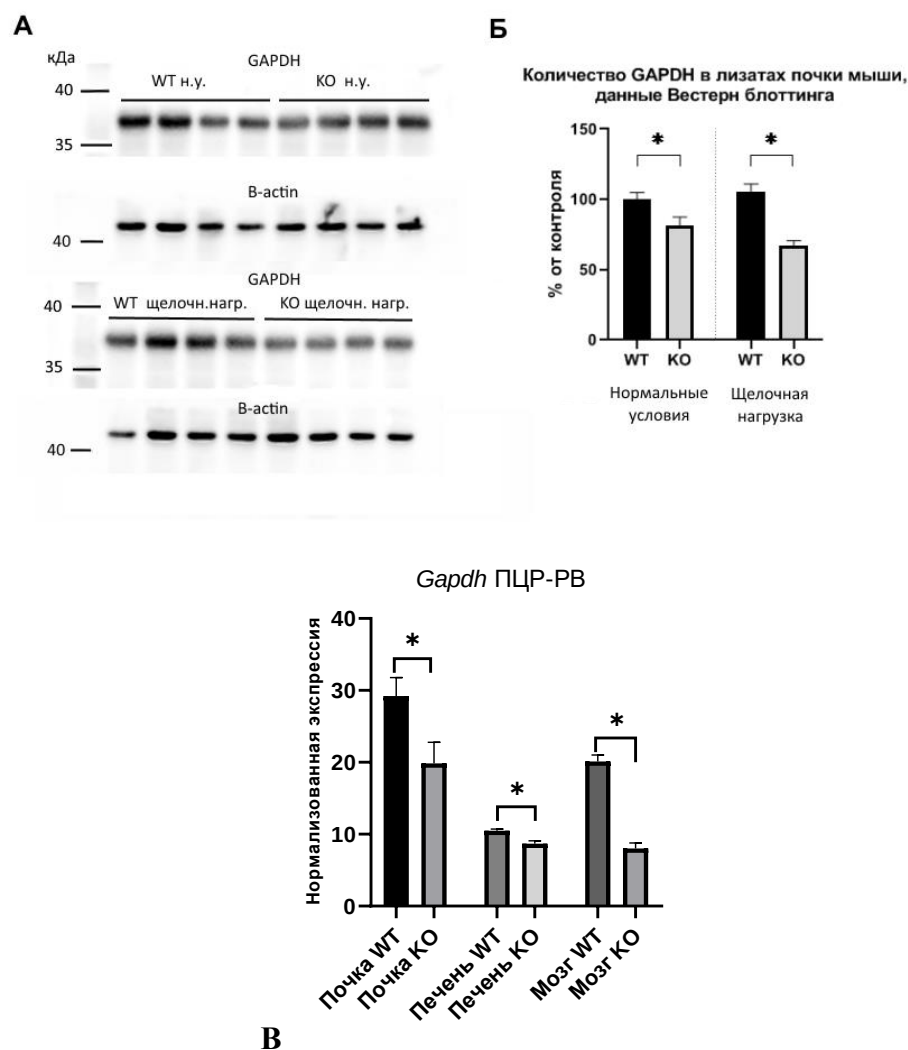


Рисунок 11 – А – Вестерн-блот анализ тотальных лизатов почек мышей. Слева указано положение белковых маркеров в геле, кДа, сверху указаны антитела, которыми производили окраску; Б – количественный анализ экспрессии глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (количество животных в каждой группе $n=4$, $*p < 0.05$). Отрезками отмечены значения среднеквадратической ошибки (SEM). WT – мыши дикого типа, KO – мыши, нокаутные по гену *insrr* В – изменение экспрессии гена *gapdh* в различных органах мыши.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования дана морфологическая и молекулярно-биологическая характеристика почек, мышей, с инактивированным геном рецепторной тирозинкиназы IRR. Исследование проведено как в нормальных условиях, так и при моделировании алкалоза. При гистологическом исследовании показано, что инактивация гена рецепторной тирозинкиназы IRR не привела к каким-либо нарушениям в строении почек. У животных дикого типа и у нокаутных мышей обнаружено структурное сходство типичной паренхимы почек, как в нормальных условиях, так и при моделировании алкалоза. Однако в условиях моделирования алкалоза обнаружены компенсаторно-приспособительные изменения. Выявлено увеличение толщины паренхимы как у нокаутных животных, так и у животных дикого типа. Кроме того, при моделировании алкалоза происходит увеличение площади почечных клубков.

В работе исследовано количество α - и β -вставочных клеток в почках мышей. Разница между животными дикого типа и с инактивацией гена *insrr* не выявлена. Также не наблюдали каких-либо изменений числа вставочных клеток при щелочной нагрузке у мышей обоих

генотипов. Исследована популяция макрофагов почек с помощью определения маркерного белка провоспалительных макрофагов – CD86, а также маркерного белка противовоспалительного макрофага – CD206. Макрофаги, экспрессирующие указанные маркеры, распределены неравномерно между корковым и мозговым веществом. Макрофаги, положительные по CD86 были ассоциированы в основном только с почечными тельцами. CD206+ макрофаги встречались как в корковом, так и в мозговом веществе. Количественная оценка CD206+ макрофагов, ассоциированных с почечными канальцами, не выявила статистически значимых различий между почками животных дикого типа и нокаутными животными, как в нормальных условиях, так и при моделировании алкалоза.

По результатам РНК-секвенирования обнаружены гены, дифференциально экспрессирующиеся в почках в отсутствие IRR, а также гены, регулируемые нагрузкой бикарбоната и зависящие от экспрессии IRR. После GO-обогащения обнаружено, что отсутствие IRR приводит к изменению экспрессии генов, связанных с метаболическими процессами. Гены, участвующие в окислительном фосфорилировании, и рибосомальные белки существенно активируются после нокаута IRR, тогда как некоторые гены мембранных транспортеров были скорее подавлены. Это указывает на то, что передача сигналов IRR участвует в энергоснабжении клеток. Если в нокаутной группе потребление бикарбоната натрия не вызывало существенного эффекта, то у мышей дикого типа оно приводило к вполне закономерному изменению активности транспортера. Объяснение столь разных ответов на моделирование экспериментального алкалоза в группах нокаута и дикого типа заключается в том, что нокаут *insrr* сам по себе вызывает изменения, сравнимые с таковыми при бикарбонатной нагрузке.

В целом, проведение исследования транскриптома животных с инактивацией гена *insrr* выявляет глубокие различия в фундаментальных процессах в клетке, таких как энергетический обмен и синтез белка, влияние которых, вероятно, сильно влияет на фенотип. Впервые в данной работе проанализирован транскриптом почек мыши в двух физиологических состояниях: базальном состоянии и бикарбонатной нагрузке, что позволило идентифицировать гены, связанные как с регуляцией кислотно-щелочного баланса, так и с функцией инсулиновых рецепторов.

ВЫВОДЫ

1. У животных с инактивированным *insrr* сохраняется нормальное гистологическое строение почки. Моделирование алкалоза приводит к компенсаторным изменениям в почках, как интактных, так и нокаутных по гену *insrr* животных: увеличение толщины паренхимы как нокаутных, так и диких животных, увеличение площади почечных телец у нокаутных животных, и увеличение диаметра собирательных трубок только у животных дикого типа.
2. Собирательные трубки у животных, с инактивированным геном *insrr*, как и у животных дикого типа выстланы высоким однослойным призматическим эпителием, число α - и β -вставочных клеток, секретирующих ионы H^+ и OH^- в мочу, не отличается от почек животных дикого типа.
3. Инактивация гена *insrr* не приводит к провоспалительной активации макрофагов почек, о чем свидетельствует локализация провоспалительных CD86+макрофагов только в составе почечных телец, а также одинаковое количество противовоспалительных CD206+ макрофагов в почке животных дикого типа и с нокаутом гена *insrr*.
4. При помощи РНК-секвенирования показано, что инактивация гена *insrr* приводит к изменению активности генов, регулирующих энергетический обмен в клетки, а именно цепь переноса электронов (*mt-Nd6*, *mt-Cytb*, *ndufa5*, *ndufs6*, *uqcrb*), синтез АТФ (*mt-Nd4*, *atpif1*, *atp5k*).
5. Данные РНК-секвенирования подтверждены методом ПЦР в реальном времени, в соответствии с которыми инактивация гена *insrr* вызывает достоверное изменение экспрессии для генов мембранных транспортеров – пендрина *slc26a4*, натрий-глюкозного обменника *slc5a2*, аквапорина 6 *aqp6*, тауринового обменника *slc6a6*, калиевого канала *kcnk5*; генов внутриклеточного метаболизма – фосфолипазы С *plcd1*, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *gapdh*, АТФазы *atp6v1g3*, рибосомального белка *rps7*. Из них в нормальных условиях увеличили свою экспрессию при инактивации гена *insrr* – *aqp6*, *rny3*, *lypd2*, *kcnk5*, *slc6a6*; уменьшили экспрессию при инактивации гена *insrr* – *slc26a4*, *rps7*, *slc5a2*, *plcd1*, *gapdh*.
6. Инактивация гена рецепторной тирозинкиназы IRR приводит к снижению числа образующихся зигот (19 зигот на 1 самку дикого типа, 12 зигот на 1 самку мышей с инактивацией гена *insrr*), а также числа бластоцист (6,7 % от общего количества извлеченных клеток у нокаутных животных и 43,8 % у животных дикого типа).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах

1. **Ганцова** Е.А., Серова О.В., Деев И.Е., Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х. Морфологические особенности почек у мышей с нокаутом гена *INSRR* в условиях бикарбонатной нагрузки // *Морфология*. - 2025. - Т. 163. - №2, в печати
2. **Ганцова** Е. А., Гавриленкова А. А., Серова О. В., Деев И. Е.. Изменение экспрессии гена *gapdh* в органах мышей, нокаутных по гену *insrr* // *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. – 2022. – Т. 505. – № 4. – с. 73–79.
3. **Gantsova**, E. A., Serova, O. V., Eladari, D., Bobrovskiy, D. M., Petrenko, A. G., Elchaninov, A. V., & Deyev, I. E. A Comparative Kidney Transcriptome Analysis of Bicarbonate-Loaded *insrr*-Null Mice // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2023. – Т. 45. – №. 12. – С. 9709-9722.
4. **Gantsova** E., Serova, O., Vishnyakova, P., Deyev, I., Elchaninov, A., & Fatkhudinov, T. Mechanisms and physiological relevance of acid-base exchange in functional units of the kidney // *PeerJ*. – 2024. – Т. 12. – С. e17316.
5. Серова О.В., **Ганцова** Е.А., Деев И.Е., Петренко А.Г. Значение рН-сенсоров в поддержании гомеостаза нервной системы // *Биоорганическая химия*. – 2020. – Т. 46. – №4. – с. 369-384.
6. **Ганцова** Е.А., Деев И.Е., Петренко А.Г., Серова О.В. Анализ развития преимплантационных эмбрионов мыши, нокаутных по гену *insrr* // *Онтогенез*. – 2022. – Т. 53. – № 3. – с. 196–202.

Другие публикации

1. **Ганцова** Е.А., Деев И.Е., Ельчанинов А.В. Нокаут рецепторной тирозинкиназы *IRR* влияет на морфологическую структуру почки мыши, Тезисы XI Российского форума биотехнологий OpenBio-2024, Новосибирск, секция Молекулярная биология, стр. 463 DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-227.
2. **Ганцова** Е.А., Гавриленкова А.А., Серова О.В., Деев И.Е. Поиск молекулярных механизмов регуляции кислотно-щелочного баланса в почках мышей с использованием РНК-секвенирования, Тезисы VIII Молодёжной Школы-конференции ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, опубликованы: *Цитология*, 2022, Т. 64, № 7, стр. 611-780
3. **Ганцова** Е.А., Серова О.В., Деев И.Е., Петренко А.Г. Поиск молекулярных мишеней, вовлеченных в контроль кислотно-щелочного баланса в почке мыши с применением транскриптомного анализа. Тезисы XXXVI Зимняя Международная Молодёжная Научная Школа Перспективные Направления Физико-химической Биологии и Биотехнологии, Москва, 2022.
4. **Ганцова** Е.А., Серова О.В., Гавриленкова А.А., Деев И.Е., Петренко А.Г. Анализ развития преимплантационных эмбрионов мышей, нокаутных по гену *insrr*. Конференция молодых учёных «Актуальные проблемы биологии развития», Москва, 2021, стр. 29-30
5. **Ганцова** Е.А., Серова О.В., Можаяев А.А., Деев И.Е., Петренко А.Г. Влияние нокаута гена *insrr* на экспрессию белков почки мыши в физиологических условиях. Тезисы XXXIII Зимняя Международная Молодёжная Научная Школа Перспективные Направления Физико-химической Биологии И Биотехнологии, Москва, 2021, стр. 110.
6. **Ганцова** Е.А., Серова О.В., Деев И.Е., Петренко А.Г. Гены рН-чувствительности, активируемые в почках нокаутных по гену *insrr* мышей при щелочной нагрузке. Тезисы VII Молодёжной Школы-конференции ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, опубликованы: *Гены & Клетки* XV, № 3, Приложение, 2020, стр. 130-131.

ГАНЦОВА ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА
(РФ)

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НОКАУТА ГЕНА РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ IRR НА ГИСТОЛОГИЧЕСКУЮ СТРУКТУРУ И ТРАНСКРИПТОМ ПОЧКИ

Проанализирована морфология почечной паренхимы у животных, с инактивированным геном рецепторной тирозинкиназы IRR и проведено сравнение ее с паренхимой почки животных не несущих подобную модификацию. Микроскопическая структура коркового и мозгового вещества, а также частей нефронов осталась типичной для животных с инактивацией гена *insrr*, включая условия моделирования экспериментальной бикарбонатной нагрузки. У животных с нокаутом по гену *insrr* толщина паренхимы, диаметр собирательных трубок и площадь почечных клубочков были меньше по сравнению с животными дикого типа при моделировании алкалоза. Количество CD86+ и CD206+ макрофагов, α -и β - вставочных клетках собирательных трубок почки в условиях нормы и при алкалозе не различалось между нокаутными животными и мышами дикого типа. Анализ РНК-секвенирования показал, что у мышей с инактивированным геном *insrr* изменяется экспрессия генов как в нормальных условиях, так и при бикарбонатной нагрузке, моделирующей алкалоз. Инактивация гена *insrr* вызывает активацию генов сигнальных путей, связанных с энергетическим обменом, а именно с цепью переноса электронов, синтезом АТФ. Гены, участвующие в окислительном фосфорилировании и кодирующие рибосомальные белки, существенно активируются после инактивации гена рецептора IRR (например, *ndufa1*, *mt-nd6*, *cox6b*, *atp6v1g3*), тогда как гены мембранных транспортеров были скорее подавлены (например, *slc26a4*, *slc16a1*, *slc5a2*), следовательно, сигнализация IRR участвует в энергоснабжении клеток. Результаты транскриптомного анализа впервые показали снижение экспрессии гена домашнего хозяйства *gapdh*, при инактивации гена *insrr*, что подтверждено, как и методом ПЦР в реальном времени, так и на белковом уровне клеток различных органов – почки, печени и головного мозга мыши. Инактивации рецептора IRR приводит к задержке развития, остановке и ассиметричному дроблению мышинных эмбрионов.

GANTSOVA ELENA ALEKSANDROVNA
(Russian Federation)

ASSESSMENT OF THE INFLUENCE OF KNOCKOUT OF THE RECEPTOR TYROSINE KINASE IRR GENE ON THE HISTOLOGICAL STRUCTURE AND TRANSCRIPTOME OF THE KIDNEY

The morphology of the renal parenchyma in animals with inactivated IRR receptor tyrosine kinase gene was analyzed and compared with the renal parenchyma of animals not carrying such a modification. The microscopic structure of the cortex and medulla, as well as parts of the nephrons, remained typical for animals with inactivation of the *insrr* gene, including the conditions of modeling an experimental bicarbonate load. In animals with knockout of the *insrr* gene, the thickness of the parenchyma, the diameter of the collecting ducts and the area of the renal glomeruli were smaller compared to wild-type animals in modeling alkalosis. The number of CD86+ and CD206+ macrophages, α - and β - intercalated cells of the collecting ducts of the kidney under normal conditions and in alkalosis did not differ between knockout animals and wild-type mice. RNA sequencing analysis showed that in mice with inactivated *insrr* gene, gene expression is altered both under normal conditions and under bicarbonate load simulating alkalosis. Inactivation of *insrr* gene causes activation of genes of signaling pathways associated with energy metabolism, namely, with the electron transport chain, ATP synthesis. Genes involved in oxidative phosphorylation and encoding ribosomal proteins are significantly activated after inactivation of IRR receptor gene (e.g., *ndufa1*, *mt-nd6*, *cox6b*, *atp6v1g3*), whereas genes of membrane transporters were rather suppressed (e.g., *slc26a4*, *slc16a1*, *slc5a2*), therefore, IRR signaling is involved in cellular energy supply. The results

of transcriptome analysis have shown for the first time a decrease in the expression of the house-keeping gene *gapdh*, with inactivation of the *insrr* gene, which is confirmed both by real-time PCR and at the protein level of cells of various organs - the kidney, liver and brain of mice. Inactivation of the IRR receptor leads to developmental delay, arrest and asymmetric cleavage of mouse embryos.