

**«Научно-исследовательский институт морфологии человека
имени академика А.П. Авцына»
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
"Российский научный центр хирургии
имени академика Б.В. Петровского"»**

На правах рукописи

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
Доцент, д.м.н. Ельчанинов Андрей Владимирович,
д.б.н. Деев Игорь Евгеньевич.

Москва 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
1. Обзор литературы.....	11
1.2. Роль частей нефрона в поддержании кислотно-щелочного баланса.....	13
1.3. Клинические проявления нарушений кислотно-щелочного обмена.....	28
1.4. Белки поддерживающие кислотно-основной баланс в почке	30
1.5. Рецепторные тирозинкиназы	33
1.6. Рецепторные тирозинкиназы как сенсоры рН.....	34
2. Материалы и методы	39
2.1. Получение однопометных мышей, анализ мышей с нокаутом гена <i>insr</i>	39
2.3. Генотипирование.....	40
2.4. Условия щелочной нагрузки, извлечение органов, подготовка образцов	41
2.5. Обзорное окрашивание гематоксилином и эозином.....	41
2.6. Иммуногистохимический анализ.....	42
2.7. Морфометрия срезов почек.....	42
2.8. РНК-секвенирование почек мышей.....	43
2.9. Выделение РНК, получение кДНК	44
2.10. ПЦР в реальном времени	45
2.11. Получение белковых лизатов и измерение концентрации белка	45
2.12. Анализ развития преимплантационных эмбрионов.....	45
2.13. Вестерн блоттинг.....	46
2.14. Статистическая обработка данных экспериментов.....	47
3. Результаты.....	48
3.1. Получение однопометных мышей и их генотипирование.....	48
3.2. Морфологическое описание почек мышей двух генотипов	51
3.3. Иммуногистохимическое окрашивание срезов почек мышей.....	55
3.4. Популяция макрофагов почек.....	57
3.5. Сравнительный анализ транскриптомов почек мышей	59

1.7. Влияние нокаута рецепторной тирозинкиназы IRR на развитие эмбрионов мыши	90
2. Обсуждение.....	95
Заключение	108
Выводы.....	110
Список литературы	111

ВВЕДЕНИЕ

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 рН, однако для различных тканей и биологических жидкостей организма его уровень значительно варьирует. Так, например, нормальные значения рН 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 [10].

Регуляция уровня кислот и оснований обеспечивается множеством молекулярных механизмов, большая часть из которых до сих пор не изучены. Одним из сенсоров щелочного рН 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) [3]. Уникальной чертой этого семейства рецепторов является их предимеризованное состояние; при взаимодействии с лигандом происходят конформационные изменения, приводящие к активации рецептора через автофосфорилирование [146]. Для рецептора IRR не был выявлен лиганд белковой природы, поэтому в литературе его обозначают, как «сиротский» рецептор [42]. В ходе экспериментов по выявлению эндогенного лиганда IRR было обнаружено, что этот рецептор может напрямую активироваться в слабощелочной внеклеточной среде [48]. Рецептор IRR демонстрирует активацию при показателях рН, 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 [148].

Наибольшее количество IRR обнаружено в почке, где IRR экспрессируется в β -вставочных клетках, выстилающих собирательные трубки нефрона, которые секретируют бикарбонат [138], [20]. Дополнительные зоны экспрессии рецептора IRR включают: энтерохромоаффиноподобные элементы слизистой желудка, эндокринные клетки поджелудочной железы (альфа- и бета-клетки островкового аппарата)[51][111]. С использованием метода РНК-секвенирования отдельных клеток показана экспрессия IRR в нейронах спинномозговых ганглиев мышей [184]. Рецепторная тирозинкиназа IRR связана с репродуктивной системой и ранним эмбриональным развитием [67]. В процессе раннего эмбриогенеза обнаружена экспрессия гена рецептора IRR (*insrr*), а также других членов семейства инсулинового рецептора – IR (*insr*)

и IGF-IR (*igf1*) [28], на стадии одноклеточных эмбрионов мыши и на стадии бластоцисты [62]. 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 [55].

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 [98]. 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 [46], а именно вывод 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 неизучено. 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 [39, 200]. Однако данных, касающихся состояния 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 [201], 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 [48].

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 [2]. Животные дикого типа и с инактивацией гена *insrr* по-разному реагировали на острый экспериментальный алкалоз, вызванный внутривенным введением 1,3% раствора бикарбоната в кровь [147]. Таким образом, инактивация гена в мышах 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 терапевтиче-

ском использовании бикарбоната натрия (NaHCO_3). Некоторые клинические и фундаментальные научные исследования продемонстрировали благотворное влияние NaHCO_3 на замедление снижения функциональности почек [11, 59, 94]. 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 [122].

Линия мышей, нокаутных по гену *insrr* была получена ранее, и исследована в работе Т. Kitamura [98, 134]. 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 [135].

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 дифферонов, который реагирует на изменение pH выраженным образом, являются макрофаги. Эта особенность макрофагов используется для доставки лекарств с помощью наночастиц [76]. Предполагают, что изменение pH влияет на макрофаги по средством NF-κB-сигнального пути [74].

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 [51]. В островковых клетках поджелудочной железы крысы рецептор IRR связан с активацией АМР-активируемой протеинкиназы (АМРК), которая играет роль энергетического сенсора регуляции клеточного метаболизма и поддержании энергетического баланса [152]. Влияние рецептора IRR на перестройку актинового цитоскелета показана в клетках островков поджелудочной железы [51], а так же в клетках печени [144]. В исследованиях рецептора IRR при злокачественных новообразованиях указывают его роль как иммуномодулятора, регулирующего синтез интерферона-β, продукцией иммуноглобулина-А, активацией деднитных клеток и Т-лимфоцитов и модуляции иммунного ответа в опухоли, а также рецептор вовлечен в регуляцию окислительного фосфори-

лирования [144, 208]. Однако такие данные, касающиеся почек, отсутствуют. На основании приведенных данных сформулированы цель и задачи исследования.

Цель исследования: изучить влияние инактивации гена *insrr* и, кодирующего его рецептора IRR, на строение и профиль экспрессии генов почки мыши 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 ее 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 относительный уровень экспрессии генов у животных в норме и при инактивации гена IRR по результатам транскриптомного анализа почечной паренхимы с помощью ПЦР в реальном времени
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

Впервые установлено влияние 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. Гены, участвующие в окислительном фосфорилировании и кодирующие рибосомальные белки, существенно активируются после нокаута IRR (например, *ndufa1*, *mt-ndb*, *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 показали снижение экспрессии гена домашнего хозяйства *gapdh*, при инактивации гена *insrr*, что было 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 асимметричному 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 трубокпочки, 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. 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»), Заключения, Выводов, Списка литературы. 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 Пушинской школе-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века" (Пушино, 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.

1. Обзор литературы

Гомеостаз - важная характеристика всех живых существ. Он включает в себя несколько взаимосвязанных систем регулирования, позволяющих поддерживать постоянную внутреннюю среду в строгом диапазоне физических и химических характеристик. Каждая система содержит сенсор, центр управления и эффектор, которые позволяют телу реагировать и адаптироваться к изменениям во внутренней и внешней среде. «Кислотно-щелочной баланс» является важным элементом гомеостаза и обеспечивает жесткий контроль как внеклеточного, так и внутриклеточного pH [65]. Он определяет относительную «кислотность» организма, то, как производятся кислоты и основания, как они сохраняются и выводятся из организма, и как взаимодействуют с другими физиологическими системами. Человеческое тело развило способность быстро корректировать отклонения от нормального диапазона физиологического pH человека. Почечная система и легочная система являются двумя основными модуляторами отклонения pH. Легочная система регулирует pH с помощью газообмена. Почечная система регулирует pH, реабсорбируя бикарбонат (HCO_3^-) и выводя кислоты (ионы H^+) [93]. Дыхательная система и ее контроль кислотно-щелочного баланса не рассматриваются в данной работе, но почечные компенсаторные механизмы для контроля кислотно-щелочного баланса будут рассмотрены подробно. Общая концентрация свободного H^+ в организме человека очень мала, и его влияние как катиона, непосредственно влияющего на химические или электрохимические градиенты, минимально. Напротив, важные физиологические эффекты изменения pH опосредуются через его влияние на движение ионизированных соединений и влияние на конформацию белков, включая ферменты, рецепторы и трансмембранные ионные каналы [83]. Эти ионизированные соединения и белки настолько распространены и многочисленны, что сложные взаимодействия между ними полностью выяснены в немногих типах клеток, если такие взаимодействия вообще имеются. Поэтому эффекты ацидоза/алкалоза на молекулярном уровне полностью не описаны. Были предложены различные пути, посредством которых изменение pH может вызывать клеточную дисфункцию, предположительно связанную с изменениями концентрации ионов калия, натрия и кальция в качестве вероятных источников повреждения. Почки, по сравнению с дыхательной системой, обеспечивают более медленную регуляцию гомеостаза - часы или дни по сравнению с минутами или часами. В почках одновременно происходит несколько процессов, регулирующих кислотно-щелочной баланс. Самая важная буферная система в организме человека - это бикарбонатная система. Вода и диоксид углерода взаимодействуют с образованием угольной кислоты, которая диссоциирует с образованием H^+ и бикарбонат-ионов (HCO_3^-). Это динамические отношения, которые находятся в постоянном движении. Некаталитическая реакция между водой и углекислым газом слишком медленная, чтобы ее можно было использовать в качестве моментальной реакции для контроля pH. Но когда реакция катализируется ферментом карбоангидра-

зой, она ускоряется до такой степени, что ограничивается только доступностью субстрата. Поддержание нормального рН с помощью бикарбонатной буферной системы опосредуется респираторными и почечными механизмами. CO_2 выводится или задерживается дыхательной системой за счет изменения частоты или глубины дыхания. Почка может варьировать выведение HCO_3^- или H^+ [4].

Человеческая почка, которая состоит из 2 миллионов нефронов (строение нефрона см. рисунок 1), выполняет основную функцию фильтрации крови, регулирует электролитный баланс, значение рН и поддерживает уровень жидкости в организме. Эксперименты на животных, в частности на мышах, в сочетании с достижениями генной инженерии и молекулярно-биологическими методами, являются основным инструментом для изучения физиологии почки. Дополнительным подходом являются исследования культур тканей *in vitro*, что является ценным инструментом для изучения физиологии почек и дает много информации, но тем не менее, они не являются идеальной моделью. Возможно, самым большим ограничением культуры ткани является то, что она не может воспроизвести сложную архитектуру почек, состоящую из нескольких типов клеток, и взаимодействие между этими клетками. Недавние исследования показали, что плюрипотентные стволовые клетки, которые способны дифференцироваться в клетки любого типа, можно использовать для образования органоидов почек. Органоиды воспроизводят многоклеточные взаимоотношения и микросреду сложных органов, таких как почки. Органоиды почек были использованы для успешного моделирования тубулярного и клубочкового заболевания, индуцированного нефротоксином, а также сложных заболеваний, таких как хроническая болезнь почек, в которой участвуют несколько типов клеток. В сочетании с методами генной инженерии, такими как редактирование генома с помощью CRISPR-Cas9, генетические заболевания почек можно воспроизвести в органоидах. Таким образом, модели органоидов могут более точно предсказывать действие лекарств, чем модели с использованием животных, что может способствовать открытию новых лекарственных средств для лечения различных заболеваний человека [5].

Животные модели применяют для решения многих научных проблем, от фундаментальной науки до разработки и улучшения новых вакцин и лекарственных средств. Животные модели также сыграли важную роль в огромном количестве научных открытий, многие из которых были отмечены Нобелевской премией. Использование животных основано не только на значительном сходстве биологии большинства млекопитающих, но и на том факте, что болезни человека часто поражают другие виды животных. Это особенно характерно для большинства инфекционных заболеваний, а также для очень распространенных состояний, таких как диабет I типа, почечная недостаточность, гипертония, аллергия, рак, эпилепсия, миопатии и т. д. Эти заболевания не только являются общими для человека и животных, но и их механизм ы часто

настолько схожи, что 90 % препаратов, используемых для лечения животных, идентичны или очень похожи на те, которые используются для лечения людей [18]. Степень генетической гомологии мыши и человека составляет 95%, тем не менее, существуют различия в виде разных семейств генов, избыточности генов и тонкой регуляции экспрессии генов на разных уровнях. Эти генетические различия вызывают различия в физиологии. В дальнейшем возникают сложности с повышением воспроизводимости экспериментальных данных и статистической достоверности. Чтобы решить эти проблемы были специально выведены инбредные линии мышей с гомогенным генетическим составом [127]. Для изучения физиологии почки существует множество мышинных моделей. В основном это модели для изучения патологических состояний почки, таких как диабет и вызванная им нефропатия [182], хроническая болезнь почек [198], поликистоз почек [174] и многие другие.

В данной работе будет идти речь о физиологической роли почек в поддержании кислотно-щелочного равновесия. Вызывает ли отсутствие рецептора IRR в почке изменения, связанные с патологическими изменениями тканей, а так же на воспаление, и какие молекулярные механизмы активируются при нокауте. Чтобы разобраться в полученных результатах, прежде всего необходимо понять роль почки в регуляции рН в организме, о чем и пойдет речь в дальнейшем. Далее будут рассмотрены основные участники метаболизма кислот и оснований в организме, роль почки в их регуляции и современные подходы к изучению физиологии почки.

1.2. Роль частей нефрона в поддержании кислотно-щелочного баланса

Основные изменения кислотно-щелочного равновесия при физиологических нарушениях происходят в плазме крови, которая является внеклеточной средой. Тем не менее, огромный вклад в метаболические изменения рН в организме вносят процессы, протекающие внутри и на поверхности клеток. Внутриклеточный и интерстициальный компартменты клеток имеют неоднородные значения рН, часто отличающиеся от физиологического значения плазмы крови – 7,2-7,4. Связано это с транспортом ионов, происходящим на границе клетки и интерстициального пространства, в том числе эпителиальных клеток, выстилающих желудочно-кишечный тракт и мочевыводящие пути, которые открываются во внешнюю среду. Внеклеточная жидкость составляет треть от всей жидкости в организме, в сравнении с внутриклеточной жидкостью, на которую приходится оставшиеся две трети [Pain и др. 1977; Schoeller и др., 1980]. Внутриклеточная жидкость состоит из интерстициальной жидкости, например, плазмы крови внутри сосудов, и межклеточной жидкости. Межклеточная жидкость связана с эпителиальными клетками, например, в ЖКТ, в почечных трубках и потовых железах. Эти органы связаны с выделительной системой организма, при болезнях потеря этих жидкостей может влиять на метаболизм. Также межклеточной жидкостью заполнены спинномозговая, плевральная и брюшная по-

лости, но так как они не выделяются во внешнюю среду, они отражают кислотно-щелочной статус, но не определяют его [164].

В организме регуляция кислотного баланса отделена от баланса оснований, поэтому далее они будут рассмотрены по отдельности.

Содержание кислот и оснований в организме регулируется отдельно. Базовые уровни неорганических ионов в плазме составляют HCO_3^- 27 ммоль/л, Cl^- 103 ммоль/л, SO_4^{2-} 0,5 ммоль/л и NH_4^+ 40 ммоль/л [14, 136]. Кислотный баланс состоит из трёх компонентов: продукции H^+ в печени в результате окисления пищевых белков, титрование этих протонов H^+ бикарбонат ионами HCO_3^- и выделением новых бикарбонат ионов HCO_3^- в организме, когда ионы аммония NH_4^+ выделяются с мочой. Главные кислоты, поступающие из пищи и затем перерабатываемые почками, это фосфорная кислота и серная кислота H_2SO_4 . Только H^+ из H_2SO_4 , который образуется в результате окисления серосодержащих аминокислот в печени, требует экскреции аммония NH_4^+ , чтобы устранить эти протоны, так как ион SO_4^{2-} имеет низкую аффинность к H^+ . В пользу этой версии кислотного баланса говорит тот факт, что суточная экскреция с мочой NH_4 и SO_4^{2-} очень похожа в миллиэквивалентном выражении. Таким образом, основной почечный ответ на хроническую кислотную нагрузку — это повышение экскреции NH_4^+ . Существует два сайта, где NH_4^+ может проникнуть в люмен нефрона — проксимальный извитой каналец и медуллярная собирательная трубка. Перенос аммония происходит через просвет толстой восходящей конечности петли Генле в медуллярную собирательную трубку, что называется медуллярный шунт аммония [81, 132]. Медуллярный шунт для NH_3 может не иметь количественного значения для выведения NH_4^+ - скорее, его основная функция может заключаться в предотвращении значительного снижения pH мочи вследствие дистальной секреции H^+ и, таким образом, минимизации риска образования осадков мочевой кислоты

Употребление фруктов и овощей приводит к бикарбонатной или щелочной нагрузке организма, которую необходимо устранить для поддержания основного баланса. Роль почек в поддержании кислотно-щелочного баланса позволяет предположить, что эта щелочная нагрузка устраняется за счет значительного увеличения выведения HCO_3^- [33]. Поскольку pH мочи близок к 6,0 в течение большей части 24-часового периода, моча содержит очень мало HCO_3^- . Дополнительное наблюдение заключается в том, что нет почечного порога или канальцевого максимума для реабсорбции HCO_3^- , потому что концентрация HCO_3^- в плазме увеличивается каждый раз, когда HCl секретруется в желудок. Если был почечный порог реабсорбции HCO_3^- имел максимум насыщения, как было предложено Питтсом и Лотспайхом [150], тогда бикарбонатурия должна происходить регулярно. Однако, измерения pH мочи не выявили такого высокого pH. Чтобы объяснить эту разницу в интерпретации, необходимо изучить связанные результаты с увеличением HCO_3^- . Когда HCl секретруется, не происходит увеличения объема

внутриклеточной жидкости, потери Cl^- и увеличения HCO_3^- . Напротив, в проведенных экспериментах объем внутриклеточной жидкости увеличивается. При введении NaHCO_3 и повышении HCO_3^- в работе Куртцмана [103] это привело к понижению канальцевого максимума реабсорбции HCO_3^- во время щелочного прилива в проксимальных извитых канальцах и очевидному почечному порогу для HCO_3^- .

Пищевая щелочная нагрузка сначала преобразуется в печени в HCO_3^- . Это сопровождается производством органических кислот в H^+ , титруемых HCO_3^- , следовательно, нагрузка щелочи устраняется, щелочной баланс поддерживается за счет выделения органических анионов вместе с ионами K^+ в моче. Это описание баланса оснований устраняет менее специфическое, эндогенное производство кислоты, одновременно показывая, что это компонент более широкой функции устранения щелочи, поступающей из пищи. Следовательно, чтобы описать роль почек в кислотно-щелочном балансе, важно учитывать выведение ежедневной пищевой щелочной нагрузки в виде органических анионов, которые могут метаболизироваться с образованием HCO_3^- в организме.

Чтобы устранить щелочь без увеличения вероятности образования CaHPO_4 (который влияет на образование почечных камней), выделяется семейство органических анионов, включая цитрат. Это не только позволяет достичь баланса щелочей при поддержании pH мочи около 6,0, но и имеет второе преимущество в плане предотвращения образования камней, поскольку это сводит к минимуму выведение ионизированного кальция за счет увеличения выведения его хелатора, цитрата. Так же важным участником выведения протонов H^+ является H^+/K^+ -АТФаза, которая участвует в метаболизме ионов K^+ в медуллярном слое почки. Об АТФазах будет упоминается в дальнейшем [82].

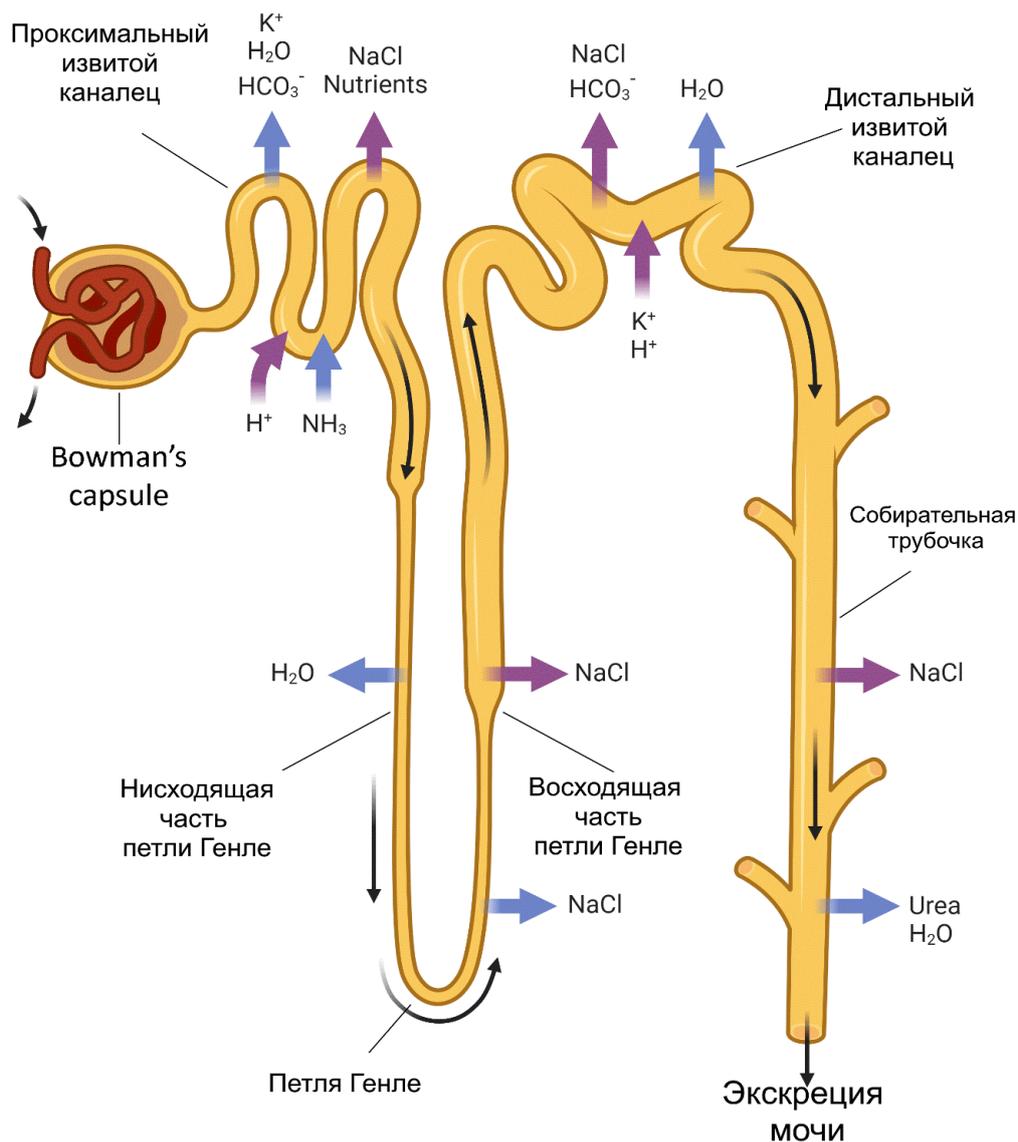


Рисунок 1 – Части нефрона, связанные с кислотно-щелочным обменом. Кислотно-щелочной обмен, или регуляция кислотно-основного состояния почек, представляет собой процесс, при котором почки выделяют кислоты, такие как ионы водорода (H^+) и отходы с мочой, и поглощают основания, такие как ионы бикарбоната (HCO_3^-), когда это необходимо. К основным частям нефрона, участвующим в кислотно-щелочном обмене, относятся проксимальные каналы, дистальные каналы и собирательные трубки. Эти сегменты способствуют кислотно-щелочному балансу, регулируя реабсорбцию и выведение ионов бикарбоната и водорода, а также других электролитов, влияющих на кислотно-щелочное состояние. Для иллюстрации компания BioRender (biorender.com) предоставила шаблоны фигур.

1.2.1. Проксимальный извитой канал

Проксимальный канал (ПК) играет важную роль в реабсорбции и переработке большого количества ионов и растворенных веществ. Примерно две трети отфильтрованной воды, $NaCl$, Ca^{2+} а также вся глюкоза, фосфаты и аминокислоты реабсорбируются целым набором специализированных транспортных систем, которые действуют на апикальной (щеточная кайма) и базолатеральной области выстилающих клеток. Различные сегменты ПК управляются электрохимическим градиентом, создаваемым базолатеральной Na^+-K^+ -АТФазой [20]. Эти

транспортные процессы требуют большого количества энергии, которая поддерживается многочисленными удлинёнными митохондриями, присутствующими в клетках проксимального канальца [100]. Кроме того, клетки ПК также реабсорбируют значительное количество альбумина и белков плазмы с низкой молекулярной массой, которые фильтруются через базальную мембрану клубочков. Эти низкомолекулярные белки включают гормоны, например, паратиреоидный гормон (ПТГ), инсулин, эпидермальный фактор роста, лептин, тиреоглобулин], белки-носители витаминов (транскобаламин-витамин В12, витамин D-связывающий белок (DBP), ретинол-связывающий белок, фолат-связывающий белок), ферменты (например, катепсин В, α -амилаза, плазминоген, урокиназа, лизоцим), липопротеины, компоненты антигена клеточной поверхности (β 2-микроглобулин), легкие цепи иммуноглобулина, а также лекарственные препараты и токсины (например, аминогликозиды, гентамицин). Поскольку большинство низкомолекулярных белков реабсорбируются и метаболизируются клетками ПК, моча человека практически лишена белков плазмы в физиологических условиях. Поглощение альбумина и низкомолекулярных белков клетками ПК в основном связано с рецепторно-опосредованным клатрин-зависимым эндоцитозом, для которого требуются два рецептора, мегалин и кубилин, а также взаимодействующий белок AMN [63].

В почке клубочковый фильтрат, по существу ультрафильтрат внеклеточной жидкости, омывает апикальную сторону проксимальных канальцев, при этом интерстициальная жидкость со стороны базолатеральной мембраны изначально похожа по содержанию на клубочковый фильтрат. Так как объем клубочкового фильтрата около 180 л в сутки, и чтобы поддерживать общий кислотно-щелочной баланс, при котором общий объем произведенной кислоты должен равняться объему выделенной кислоты, практически всё количество бикарбонат-иона должно быть реабсорбировано. На апикальных мембранах проксимальных канальцев находятся натрий-водородный обменник NHE3 и H^+ -АТФаза, которые закисляют люмен и защелачивают клетки, что требует около 85% от всей реабсорбции бикарбоната. В щелочной среде клетки фермент карбоангидраза (CA VI) катализирует реакцию $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$. Натрий-бикарбонатный транспортер NBC со стехиометрией $1 Na^+/3 HCO_3^-$ обеспечивает движущую силу для транспорта бикарбоната через базолатеральную мембрану, что поддерживает pH в проксимальном канальце [26, 159]. Таким образом, проксимальный каналец отвечает за примерно 80% всей реабсорбции HCO_3^- . Он также производит «новый бикарбонат», который нейтрализует минеральные кислоты, выделяющиеся в процессе метаболизма. Восходящая часть петли Генле реабсорбирует остальные 10 % HCO_3^- , и около 10% всасывается в последующих отделах нефрона, в его дистальном конце, что приводит к фактическому отсутствию бикарбоната в моче. Помимо ранее упомянутой карбоангидразы и натрий-протонного обменника NHE3, в процессе участвуют H^+ насос АТФаза V-типа. Клетки перемещают HCO_3^- в интерстициальную

жидкость, и в конечном счете, в кровь, главным образом через электрогенный $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -копереносчик NBCe1-A (почечный сплайс вариант). Большая часть H^+ , который ПК выделяет в просвет, титруется отфильтрованным HCO_3^- , образуя CO_2 и H_2O под влиянием карбоангидразы IV, находящейся на апикальной мембране. H_2O пересекает апикальную мембрану исключительно через водный канал аквапорин 1 (AQP1), и этот же белок - теперь действующий как газовый канал - по-видимому, также обеспечивает большую часть транспорта CO_2 . Итоговым эффектом процессов является реабсорбция NaHCO_3 . Небольшая часть H^+ , которую ПК выделяет в просвет, титрует различные люминальные буферы (например, NH_3 , неорганический фосфат, креатинин), в которых можно измерить как экскрецию NH_4^+ , так и образование кислоты [26] Общая схема транспорта в проксимальном канальце показана на рисунке 2.

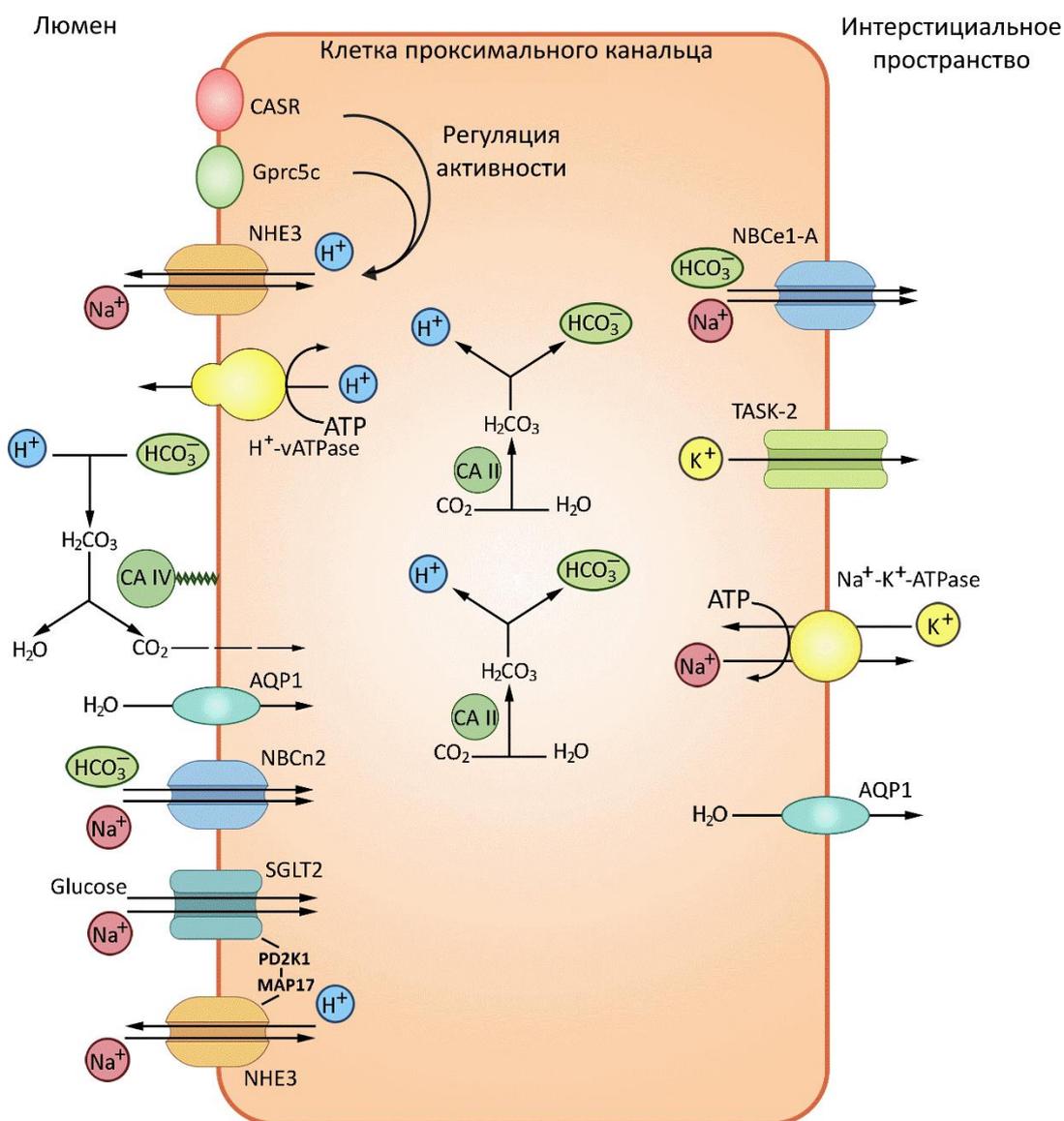


Рисунок 2 – Модель кислотно-основного транспорта в проксимальном канальце (ПК). NHE3, обменник Na^+/H^+ 3; AQP1, аквапорин 1; CA II и CA IV, карбоангидразы II и IV; NBCe1-A, электрогенный ко-транспортер $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 1, вариант сплайсинга A. Адаптировано из [26]

Регуляция всасывания бикарбоната в проксимальном канальце происходит благодаря рН-чувствительным молекулам, таким как нерецепторная тирозинкиназа Ruk2, рецептор эндотелина В (активатором которого является эндогенный почечный эндотелин), коактивация ErbB1/2, ERK и рецептора ангиотензина I [27]. Это необходимо для увеличения секреции протонов H^+ и опосредованного усиления работы натрий-протонного обменника. Различные гормоны влияют на проксимальную реабсорбцию HCO_3^- . Некоторые из этих гормонов действуют кратковременно (реакция от минут до часов), а другие действуют в течение более длительных периодов (дней). Например, в острой форме адренергические агонисты и ангиотензин II стимулируют реабсорбцию HCO_3^- . Гормон паращитовидной железы, действующий через цАМФ, подавляет всасывание бикарбоната, однако гиперкальциемия, напротив, стимулирует проксимальную реабсорбцию HCO_3^- . С. При хронической кислотной нагрузке или ацидозе внутрипочечный эндотелин-1, действующий через рецептор эндотелина В, был идентифицирован как решающий элемент в повышении регуляции обмена Na^+/H^+ [197]. Глюкокортикоиды также важны для развития проксимального транспорта HCO_3^- и могут быть важны при хроническом ответе на ацидоз [25]. Несмотря на сложную регуляцию проксимальной реабсорбции HCO_3^- , результат не влияет напрямую на общую экскрецию кислоты через почки или экскрецию HCO_3^- в мочу, потому что дополнительная реабсорбция HCO_3^- и секреция кислоты происходят в дистальных отделах нефрона.

1.2.2. Петля Генле

Продолжением проксимального извитого канальца является петля Генле, которая проходит в корковом веществе, затем в виде U-образной эпителиальной трубки возвращается обратно в корковое вещество, где продолжается в дистальный извитой каналец. Она состоит из тонкого и толстого отдела, нисходящего и восходящего колена [140]. Нисходящая часть не участвует в транспорте ионов, так как проницаема только для воды, в ней присутствуют аквапорины AQP1, AQP3. Вода транспортируется через эпителий нисходящего тонкого колена через AQP1 и AQP3 в апикальных и базолатеральных плазматических мембранах с движущей силой, обеспечиваемой небольшими постоянными осмотическими градиентами, создаваемыми векторным движением растворенных веществ через определенные транспортные белки в этих мембранах [6].

Толстая восходящая ветвь петли Генле (сегмент TAL) отвечает за образование концентрированной мочи при антидиурезе (малый объем мочи с высокой концентрацией осмотически активных веществ) и разбавленной мочи при водном диурезе (большой объем мочи с очень низкой экскрецией осмотических веществ). Этот сегмент нефрона разбавляет жидкость в просвете и создает гипертонический градиент в межтканевом пространстве, поскольку он способен реабсорбировать NaCl и предотвращать соответствующую реабсорбцию воды за счет своей во-

донепроницаемости. При антидиурезе интерстициальный гипертоonus используется для вывода воды из собирающих протоков, в результате чего образуется высококонцентрированная моча. При водном диурезе собирательные трубки непроницаемы для воды, и разбавленная жидкость канальцев выводится с мочой [77].

Петля Генле ответственна за реабсорбцию 40% отфильтрованного Na^+ , в основном в толстой восходящей петле. В этом случае вход Na^+ из просвета в клетки происходит в основном через люминальный электронейтральный $\text{Na}^+/\text{K}^+/2 \text{Cl}^-$ котранспортер, NKCC2, кодируемый геном *slc12a1*. Этот котранспортер опосредует активный транспорт Na^+ , K^+ и 2Cl^- с захватом через апикальную мембрану. Белок принадлежит к 12 семейству транспортеров растворенных веществ, которое включает две изоформы у человека, кодируемые двумя генами, *slc12a1* (NKCC2) и *slc12a2* (NKCC1). В то время как NKCC1 широко экспрессируется в нескольких органах и тканях, NKCC2 локализуется исключительно вдоль сегмента TAL [206]. После реабсорбции из просвета ионы Na^+ покидают клетку через натриевый насос. Каналы Cl^- -Ка и Cl^- -Кв с их субъединицей Бартина опосредуют выход Cl^- с базолатеральной стороны [88]. Наконец, K^+ ионы доставляются обратно в просвет через почечный наружный медулярный калиевый канал (ROMK). Эти каналы выполняют двойную важную роль в TAL: во-первых, они выделяют K^+ в просвет, что необходимо для создания градиента для последующей реабсорбции соли; во-вторых, они устанавливают положительное напряжение на мембране эпителиальных клеток, которое управляет околоклеточной реабсорбцией катионов. Кроме того, по этому пути реабсорбируются другие катионы (Ca^{2+} и Mg^{2+}). Нет сомнений в том, что большая часть реабсорбции Ca^{2+} вдоль TAL происходит через околоклеточный путь, следуя электрохимическому градиенту. NKCC2 и ROMK генерируют «движущую силу» для околоклеточного транспорта катионов [205]. Совместная активность основных транспортеров и каналов, участвующих в абсорбции соли (NKCC2, ROMK, хлоридный канал Cl^- -Кв) является предпосылкой для предотвращения дисбаланса электролитов. Утрата функции любого из этих белков приводит к фенотипу потери соли. Поскольку абсорбция соли в TAL находится под контролем гормонов, местных медиаторов и нескольких внутриклеточных сигнальных путей, нередко нарушение абсорбции соли является вторичным по отношению к этим дисфункциям. Например, было описано, что активирующие мутации в генах ионных транспортеров, описанных выше, приводят к нефропатии с потерей соли. Аналогичным образом было показано, что дисфункция уромодулина, Ste20-связанной пролин-аланин-богатой киназы (SPAK) и киназы реакции на окислительный стресс (OSR1) влияет на активность NKCC2 и определяет дисбаланс жидкости и электролитов [190].

Роль петли Генле в поддержании кислотно-щелочного баланса очень значительна, ведь в ней происходит реабсорбция около 10-15% отфильтрованного из первичной мочи бикарбоната.

Исследования *in vivo* демонстрируют, что нисходящая часть петли Генле имеет низкую проницаемость для бикарбоната у крыс. Исследования микропункций показали, что концентрация бикарбоната значительно увеличивается на кончике петли Генле, скорее всего как косвенный эффект, связанный с концентрацией люминальной жидкости из-за реабсорбции воды вдоль нисходящей конечности [31]. В TAL бикарбонат реабсорбируется через трансцеллюлярный путь; основной механизм напоминает реабсорбцию бикарбоната в проксимальном канальце через активность обменника Na^+/H^+ (NHE). Изоформы NHE2 и NHE3 локализованы на мембране. Вклад активности NHE2 считается низким, поскольку добавление нокадауна NHE2 у мышей не приводило к явному кислотно-щелочному нарушению по сравнению с мышами с нокаутом NHE3 [107, 191]. Исследования перфузии *in vivo* и *ex vivo* показали, что реабсорбция бикарбоната требует карбоангидразы и стимулируется буметанидом. Выход бикарбоната из клеток опосредуется $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменником 2 (AE2). В просвете присутствует обменник 1 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE1), который участвует в реабсорбции Na^+ путем связывания активности Na^+/H^+ [61, 91]. Помимо NHE3, в реабсорбцию бикарбоната вносят вклад дополнительные молекулы. Функциональные исследования подтвердили наличие активной H^+ -АТФазы, а иммуногистохимический анализ сообщил о присутствии протонной АТФазы вдоль TAL. Ее роль в реабсорбции бикарбоната не считается такой постоянной, как роль Na^+/H^+ -обменника при физиологических условиях, но тем не менее ее присутствие важно для регуляции баланса кислот и оснований в нефроне. Изменения кислотно-щелочного баланса модулируют скорость реабсорбции бикарбоната вдоль TAL: как острый, так и хронический метаболический ацидоз усиливаются, пока метаболический алкалоз подавляет реабсорбцию бикарбоната. Функциональные исследования показали, что и H^+ -АТФаза, и Na^+/H^+ обменник способны адаптироваться к изменениям кислотно-основного статуса, вероятно, за счет гормональной стимуляции глюкокортикоидами и альдостероном [30]. Регуляция аммиака так же важна в регуляции ионного обмена в Петле Генле. Выведение аммиака с мочой происходит в основном за счет почечного образования из глутамин-иона аммония (NH_4^+), а не за счет клубочковой фильтрации, и дальнейшего его попадания в просвет восходящего колена петли Генле [195]. TAL играет решающую роль в реабсорбции аммиака; этот процесс происходит через NKCC2 в сайте связывания K^+ . Обмен K^+/NH_4^+ и перенос K^+ также были описаны в TAL, но их вклад менее значителен по сравнению с NKCC2. Базолатеральный выход катионов опосредован $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ -обменом через NHE4, через котранспортер Na^+ -бикарбоната NBCn1 и Cl^- -зависимым путем [24]. Общая схема транспорта в Петле Генле показана на рисунке 3.

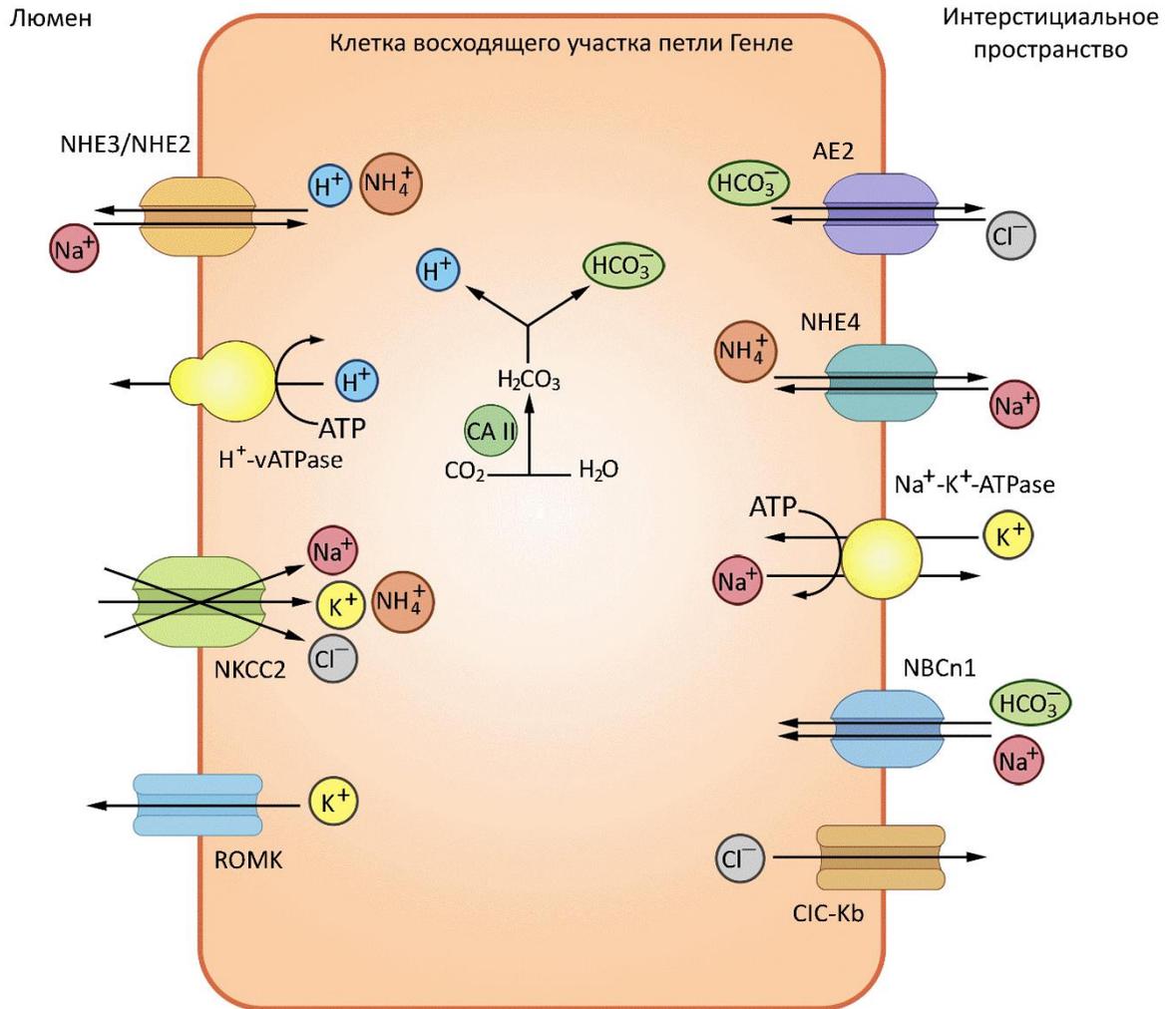


Рисунок 3 – Модель кислотно-основного транспорта в толстом восходящем колене Петли Генле. NHE2/NHE3, изоформы 2 и 3 обменников Na^+/H^+ ; CA IV, изоформа IV карбоангидразы; CA II, изоформа II карбоангидразы; NKCC2, котранспортер $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$; AE2, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ антипортер; TAL, толстое восходящее колено петли Генле. Адаптировано из [206]

1.2.3. Дистальный извитой каналец

Следующий отдел нефрона, непосредственно участвующий в регуляции pH в организме – это дистальный извитой каналец (ДК). ДК – короткий, но критически важный сегмент нефрона. Он состоит из двух отдельных подсегментов; оба подотдела обладают высокой метаболической активностью и играют ключевую роль в гомеостазе натрия, калия и двухвалентных катионов. Он также является участником обратного всасывания бикарбоната. ДК содержит NHE2, изоформу натрий-протонного обменника, описанного ранее. В клетках ДК много митохондрий, что означает участие ДК в процессах, которые требуют значительного потребления АТФ и активного транспорта электролитов, управляемого базолатеральной Na^+/K^+ -АТФазой. Считается, что базолатеральный выход бикарбоната происходит за счет обмена $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, при участии транспортера AE2, и может также включать базолатеральный Cl^- канал с частичной проницае-

мостью для HCO_3^- . Цитозольная карбоангидраза CA II присутствует и, вероятно, способствует реабсорбции бикарбоната, но апикальная карбоангидраза CA IV в ДК отсутствует [176]. Для дистального извитого канальца характерен транспорт ионов натрия, калия и хлорид-аниона. Главные участники транспорта натрия, которого в ДК всасывается до 10% от общего объема, это тиазид-чувствительный котранспортер NaCl (NCC, SLC12A3); натрий-зависимый хлоридно-бикарбонатный обменник (NDCBE, SLC4A8); [110] амилорид-чувствительный эпителиальный натриевый канал (ENaC). NCC регулируется сложным каскадом взаимодействий серин-треониновых киназ SPAK и OCR-1, регулируемых безлизиновой (аминокислота лизин = K) WNK киназой. Транспорт хлоридов осуществляется хлоридным каналом ClC-Kb и котранспортером хлорида калия 4 (KCC4; SLC12A7). Секреция K^+ в дистальном нефроне зависит от больших каналов K^+ (BK), и внешнего медуллярного калиевого канала (ROMK) [126] см.рисунок 4.

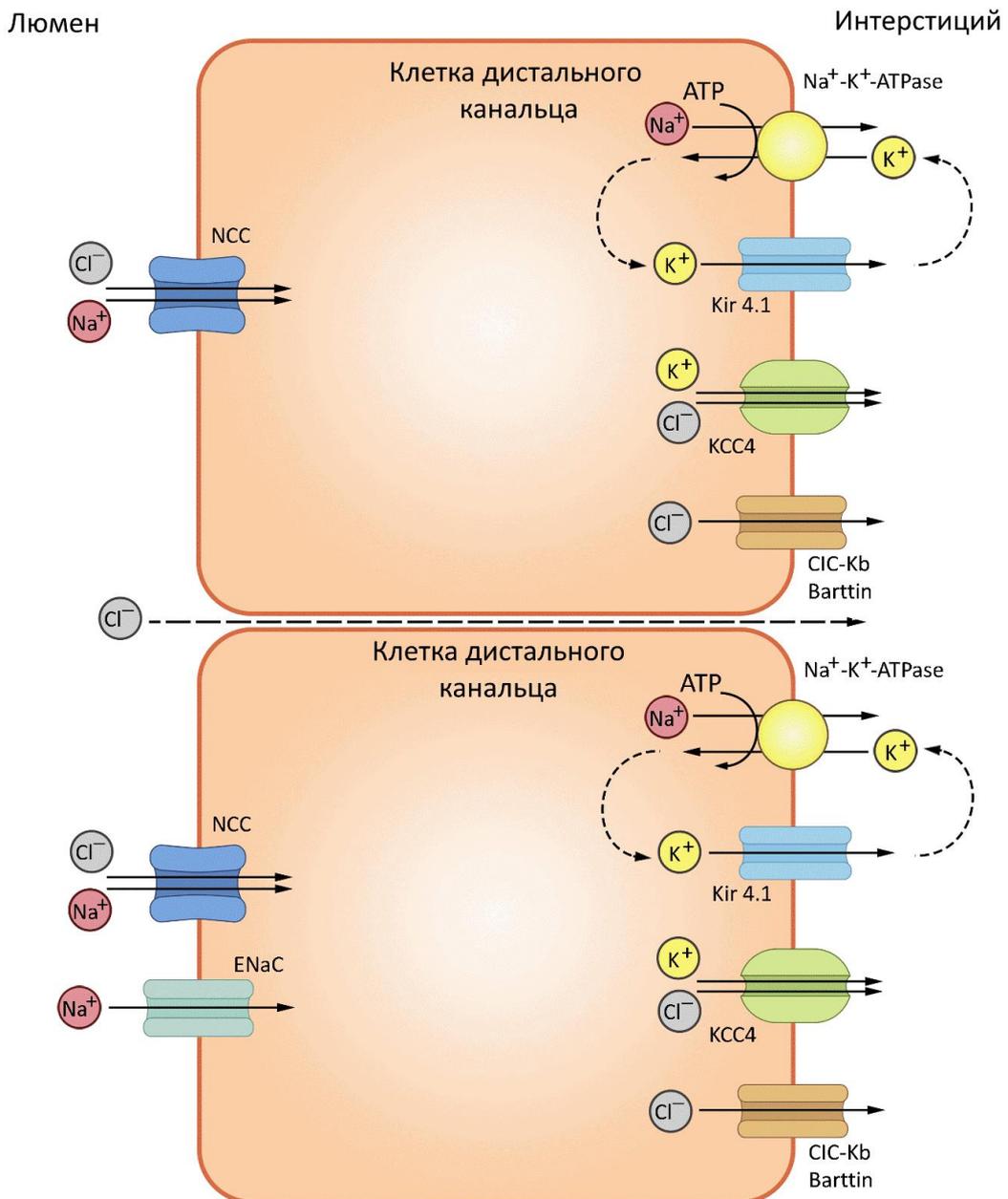


Рисунок 4 – Модель кислотно-основного транспорта в дистальном извитом канальце. NCC – котранспортер NaCl; ENaC – эпителиальный натриевый канал; ClC-Kb – хлоридный канал; KCC4 – калий-хлоридный котранспортер; DCT – дистальный извитой каналец. Адаптировано из [176]

1.2.4. Собираательные трубки

Система собираательных трубок почек состоит из серии каналов и канальцев, которые соединяют нефроны с мочеточником. Она играет важную роль в регуляции метаболизма жидкости и электролитов посредством выведения и реабсорбции, процессов, регулируемых стероидным гормоном альдостероном и антидиуретическим гормоном вазопрессином. Система собираательных трубок состоит из нескольких компонентов, включая соединительные канальцы, кортикальные собираательные трубки и медуллярные собираательные трубки [23]. В собираательном канале присутствуют два типа клеток, различающихся морфологически и функционально: основные клетки (principal cells – PC) и клетки (intercalated cells – IC). Гомеостатический баланс воды, электролитов и кислотно-щелочное равновесие регулируется экспрессией многих переносчиков в PC и IC. PC экспрессируют апикальный эпителиальный Na⁺ канал (ENaC) и водный канал AQP2, а также расположенные на базолатеральной мембране водные каналы AQP3 и AQP4. В совокупности они регулируют баланс воды и натрия. AQP2 является маркером клеток в соединительном канальце, кортикальном собираательном канале, внешней медуллярной собираательной трубке и внутренней медуллярной собираательной трубке, то есть на протяжении всей системы собираательных трубок почек. В соответствии с их основной ролью в регуляции кислотно-щелочного баланса, IC экспрессируют H⁺-АТФазу вакуолярного типа и карбоангидразу II, CAII. V-АТФазы подкисляют несколько внутриклеточных органелл и перекачивают протоны через плазматические мембраны в широком спектре типов клеток. Транспорт протонов через внутриклеточные и плазматические мембраны связан с гидролизом АТФ посредством V-АТФазы. Ранее упоминалось, что карбоангидразы принадлежат к семейству ферментов, которые катализируют производство бикарбоната и протонов из диоксида углерода и воды. Вставочные клетки можно далее разделить на два типа в соответствии с их иммунологическими различиями: α-IC и β-IC. В таблице 1 представлены основные процессы во вставочных клетках и транспортеры, участвующие в этих процессах.

Таблица 1 Типы вставочных клетки собирательной трубки почки

Типы клеток	Секретируют	Реабсорбируют
α -вставочные клетки	кислоту (через апикальную H^+ -АТФазу и H^+ / K^+ обменник) в виде ионов водорода	бикарбонат (через АЕ1, базолатеральный обменник Cl^- / HCO_3^-)
β -вставочные клетки	бикарбонат (через пендрин специализированный апикальный Cl^- / HCO_3^- транспортер)	кислоту (через базальную H^+ -АТФазу)
не- α не- β вставочные клетки	кислоту (через апикальную H^+ АТФазу и H^+ / K^+ обменник) и бикарбонат (через пендрин)	-

α -IC содержат V-АТФазу на апикальной мембране и Cl^-/HCO_3^- анионообменник 1 (АЕ1) на базолатеральной мембране, который отвечает за секрецию протонов в мочу и реабсорбцию бикарбоната соответственно. Растворимая аденилатциклаза (sAC) и протеинкиназа А (РКА) играют важную роль в регуляции H^+ -АТФазы. Slc26a11 (A11), электрогенный переносчик Cl^- также экспрессируется на апикальной мембране вставочных клеток α -IC [161]. Подкисленная моча может предотвратить рост бактерий и других микроорганизмов в моче. Тем не менее, хотя предотвращение инфекции мочевыводящих путей не является для α -IC основной ролью, существуют недавние исследования, которые выявили новый механизм, с помощью которого α -IC участвуют во врожденной иммунной защите от инфекции мочевыводящих путей. α -IC продуцируют и высвобождают липокалин, связанный с желатиназой нейтрофилов, для взаимодействия с молекулами сидерофоров. Сидерофоры представляют собой небольшие высокоаффинные хелатирующие железо соединения, которые секретируются микроорганизмами, такими как бактерии и грибы, и служат главным образом для переноса железа через клеточные мембраны [142].

β -IC характеризуются апикальной экспрессией пендрина (SLC26A4), который секретирует бикарбонат, и базолатеральной экспрессией V-АТФазы, которая реабсорбирует протоны и Na-зависимый Cl^-/HCO_3^- обменник (NDCBE) [61]. Кроме того, существуют не- α и не- β IC, которые экспрессируют как пендрин, так и V-АТФазу на апикальной мембране и, вероятно, сек-

ретируют бикарбонаты и протоны. В отличие от широкого распространения основных клеток (PC) в почке, вставочные клетки распространены не так широко. α -IC обнаруживаются в соединительных канальцах, корковых собирательных трубках и начальной части внутренних собирательных трубок медуллярной части почки. β -IC в избытке присутствуют только в соединительных канальцах и корковых собирательных трубках. Помимо этих основных переносчиков, другие важные каналы также обнаруживаются в клетках собирательной трубки, такие как обменники хлорида/бикарбоната SLC26A7 и SLC26A11, AE4 (SLC4A9) и Na^+/K^+ -АТФаза [35].

Интересен также связанный с G-белком рецептор, участвующий в гомеостазе почек, Gpr116, он экспрессируется в IC- α собирательных трубок. Специфическая для канальцев инактивация Gpr116 у мышей приводит к закислению мочи и легкому системному алкалозу; выявлено нарушение распределения протонных насосов V-АТФазы на поверхности IC- α . Gpr4, еще одна молекула, чувствительная к закислению, экспрессируемая в собирательных трубках, также имеет важное значение: генетическая инактивация Gpr4 снижает чистую секрецию кислоты, что приводит к ацидозу [207].

Система собирательных трубок также осуществляет транспорт $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, регулируемый сложным процессом, в котором участвуют резус-гликопротеина: RhB (SLC42A2) и RhC (SLC42A3) [86, 178]. Rhbg экспрессируется в IC- α и не- α , не- β вставочных клетках, основных клетках базолатеральной плазматической мембраны. Rhbd не обнаружен в IC- β . Rhbg представлен в апикальной и базолатеральной мембране в клетках типа IC- α и PC, но он также экспрессируется в апикальной плазматической мембране вставочных не- α и не- β -клеток. Недавние исследования показывают, что RhC специфически участвует в транспорте молекулярной формы (NH_3), тогда как RhB участвует в транспорте как NH_3 , так и NH_4^+ [196]. Двойной нокаут этих белков подтверждает роль RhB/C в реакции почек на метаболический ацидоз. По сравнению с мышами дикого типа, у мышей с делецией Rhbg и Rhcg в собирательных трубках наблюдался значительно более тяжелый метаболический ацидоз, в сравнении с метаболическим ацидозом, индуцированным HCl [108]. Схема мембранного транспорта ионов в собирательных трубках представлена на рисунке 5.

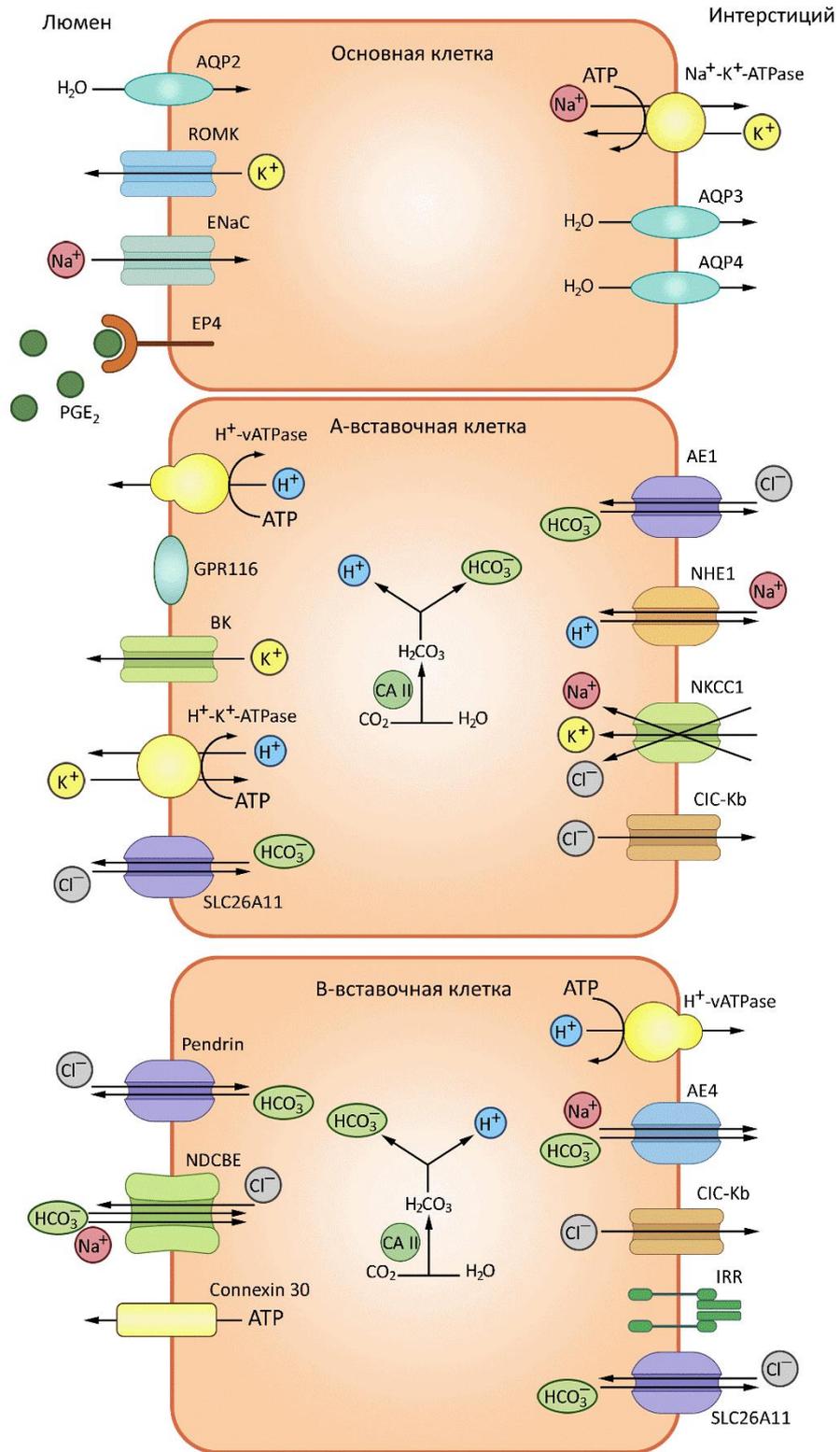


Рисунок 5 – Модель кислотно-основного транспорта в кортикальных собирательных трубках. Представлены основные переносчики в основных клетках – РС, α -вставочных клетках – А-ИС, β -вставочных клетках – В-ИС. Описание переносчиков см. в тексте. Адаптировано из [47].

1.3. Клинические проявления нарушений кислотно-щелочного обмена

Различные клинические сценарии могут повлиять на изменение в почке кислотно-щелочного равновесия. Эти метаболические нарушения можно разделить на:

- повышенное производство кислот
- потеря кислот
- увеличение производства/удержания бикарбоната
- потеря бикарбоната

Повышенное производство кислоты. Диабетический кетоацидоз - пример повышенной выработки сильной кислоты. В отсутствие инсулина свободные жирные кислоты высвобождаются из жировой ткани. Затем эти жирные кислоты окисляются с образованием кетоновых тел, кислых соединений, которые обеспечивают субстрат для производства энергии в состоянии дефицита инсулина. Кетоновые тела, ацетоуксусная кислота и В-гидроксибутират, подавляют буферную систему бикарбоната и вызывают падение рН, что приводит к метаболическому ацидозу [166]. Учитывая патогенез этого нарушения, необходимо, прежде всего, назначить или скорректировать инсулинотерапию, а также соответствующую инфузионную терапию. Больным вводят физиологический раствор, а при снижении рН ниже 6,9 вводят бикарбонат натрия [75].

Потеря кислоты. Стеноз привратника представляет собой сужение отверстия, ведущего из желудка к двенадцатиперстной кишке, это состояние приводит к оттоку желудочного сока [29]. У пациента возникает обезвоживание и рвота, достаточно сильная, чтобы вызвать потерю соляной кислоты и, следовательно, общую потерю кислоты из организма. При этом развивается гипохлоремический метаболический алкалоз. Варианты лечения включают введение аргинина гидрохлорида; дозы зависят от веса пациента и клинических лабораторных показателей [167]. Ингибитор карбоангидразы ацетазоламид считается безопасным и эффективным средством лечения метаболического алкалоза в детской кардиологии [128].

Повышенное производство/удержание бикарбоната. У пациентов со смешанной дыхательной недостаточностью или дыхательной недостаточностью 2 типа часто развивается метаболический алкалоз с повышенным уровнем бикарбоната для компенсации ранее повышенного уровня CO_2 . Этот «постгиперкапнический алкалоз» подавляет их дыхательную активность. Ацетазоламид, ингибитор карбоангидразы с мягким диуретическим действием, увеличивает скорость экскреции бикарбоната с мочой, тем самым облегчая системный алкалоз [79]. Общий положительный эффект позволяет перейти с искусственной вентиляции легких на самостоятельное дыхание. Это снижает угнетающее действие на дыхательную активность и приводит к отказу от инвазивной респираторной поддержки и искусственной вентиляции легких.

Потеря бикарбоната. Альпинисты на большой высоте испытывают низкое парциальное давление кислорода и в результате начинают гипервентиляцию для насыщения кислородом. Возникающее в результате увеличение выдыхаемого CO_2 вызывает гипокапнию и респираторный алкалоз, препятствуя дальнейшему увеличению вентиляции. Со временем это компенсируется повышенной потерей бикарбоната почками, нормализацией pH. Здесь также можно использовать ацетазоламид, вызывая выведение бикарбоната и небольшое увеличение концентрации протонов водорода в плазме. Это можно использовать для смягчения последствий высотной болезни, облегчая раннюю гипервентиляцию и, следовательно, повышать оксигенацию (акклиматизацию) [41, 180].

Важно учитывать генетическую основу конкретных нарушений гомеостаза кислот и оснований, в частности мутаций, влияющих на транспорт бикарбоната в почках. Мутации в SLC26A1 и SLC26A6 связаны с дефектной реабсорбцией бикарбоната, дистальным почечным канальцевым ацидозом и потерей бикарбоната с мочой, хотя механизм остается неизвестным [112, 187]. Муковисцидоз (МВ) — это наследственное заболевание, возникающее в результате мутаций регулятора трансмембранной проводимости муковисцидоза (CFTR), влияющего на секрецию бикарбоната в кортикальной собирательной системе как части фенотипа муковисцидоза. Нарушение регуляции выведения бикарбоната почками может привести к системному метаболическому алкалозу [102]. Ca^{2+} -активируемый Cl^- канал TMEM16A и аквапорин 2 играют центральную роль в аутосомно-доминантном поликистозе почек (ADPKD) [137, 179]. Нарушение регуляции SLC4A1 связано с дистальным канальцевым ацидозом, а мутантные SLC4A2, SLC4A4 и SLC4A5 участвуют в нарушении проксимальной реабсорбции бикарбоната [57, 210]. Мутации в SLC34A1 связаны с нефрокальцинозом, гипероксалурией и гиперкальциурией [92]. Мутированные протонные насосы ATP6V1B1 и ATP6V0A4 связаны с дистальным тубулярным ацидозом почек (ТБА) при нефрокальцинозе. Мутации карбоангидразы II (CAII) приводят к смешанным проксимальным и дистальным ТБА (ТБА III типа) различной степени тяжести, часто связанным с нефрокальцинозом и нефролитиазом [8, 60].

COVID-19 представляет собой серьезную проблему для здравоохранения на глобальном уровне, и патофизиологические аспекты COVID-19 остаются в центре внимания. Изменение электролитного обмена у пациентов с COVID-19 связано с тяжестью и смертностью заболевания [113, 181]. Недавнее исследование Цзян и др. выявил 100%-ную частоту метаболического алкалоза в когорте пациентов в критическом состоянии со смертностью 81,3% по сравнению с 50%-ной заболеваемостью у пациентов с тяжелой формой заболевания и смертностью 21,4% [97]. Аль-Аззам и др. также демонстрируют значительную связь измененного гомеостаза с показателями смертности среди пациентов с диагнозом COVID-19 [7], при этом значительно более высокие риски летального исхода у пациентов с метаболическим ацидозом, связанным с

дыхательной компенсацией, респираторной компенсацией, алкалоз с метаболической компенсацией и даже у больных с некомпенсированным респираторным ацидозом. Мансури и др. наблюдали кислотно-щелочной дисбаланс у 87,7% пациентов, госпитализированных с COVID-19, в частности респираторный алкалоз в 22,4% случаев [123]. В ряде других исследований респираторный алкалоз рассматривается как частое осложнение при COVID-19, связанное с более высоким риском тяжелых клинических проявлений и определенно являющееся показанием для интенсивного наблюдения. С другой стороны, учитывая разнообразие кислотно-щелочных дисбалансов при COVID-19, сложно предложить универсальный протокол коррекции респираторной поддержки в сочетании с инфузионной терапией [9].

1.4. Белки поддерживающие кислотно-основной баланс в почке

В проделанной работе большая часть результатов связана с мембранными белками, участвующими в поддержании кислотно-щелочного баланса в почке, поэтому о части из них нужен дополнительный обзор источников, для четкого понимания их роли.

Пендрин представляет собой Na^+ независимый обменник $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, который локализуется в β -вставочных клетках и вставочных клетках не-А, не-В типа. Пендрин кодируется геном *slc26a4*. Клетки типа β осуществляют абсорбцию Cl^- и секрецию HCO_3^- , главным образом, с помощью опосредованного пендрином обмена. В фармакологической терапии патологических состояний, препараты, действующие на пендрин используют в тандеме с препаратами для Na^+ зависимого $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменника (NDCBE), кодируемым *Slc4a8*, чтобы опосредовать абсорбцию NaCl . Процесс обмена $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ в значительной степени активируется в животных моделях метаболического алкалоза, например, после введения альдостерона или добавления бикарбоната в питье, или пищу. Он также активируется ангиотензином II. У *Slc26a4* (-/-) нокаутных мышей в отсутствие пендрина, при стимуляции альдостероном всасывание NaCl снижается, что снижает артериальное давление и усиливает алкалоз, возникающий после введения этого стероидного гормона. Пендрин модулирует индуцированное альдостероном всасывание Na^+ , изменяя количество и функцию ENaC посредством специфичного для почек механизма, который не включает изменение концентрации циркулирующего гормона, увеличивая концентрацию бикарбоната и уменьшая концентрацию АТФ в просвете собирательной трубки [51].

Водопроницаемость биологических мембран была давней проблемой в физиологии, но белки, ответственные за это, оставались неизвестными до открытия белка водных каналов аквапорина 1 (AQP1). AQP1 избирательно проницаем для воды под действием осмотических градиентов. Атомная структура человеческого AQP1 была недавно определена. Каждая субъединица тетрамера содержит отдельную водную пору, которая позволяет проходить молекулам воды одним кластером, но прерывает водородные связи, необходимые для прохождения протонов. Идентифицировано не менее 10 аквапоринов млекопитающих, которые избирательно пропускают

кают воду или воду с глицерином (акваглицеропорины). Более 200 членов семейства аквапоринов были обнаружены в растениях, микробах, беспозвоночных и позвоночных, и их значение для физиологии этих организмов выясняется [6]. AQP6 - ионный канал собирательных трубок почек. Функциональный репертуар аквапоринов был расширен с открытием AQP6. Он был обнаружен в секретирующих кислоту α -вставочных клетках из собирательного канала почек, где белок был экспрессирован внутри клетки [202]. Дальнейший анализ показал, что AQP6 локализуется вместе с H^+ -АТФазой во внутриклеточных пузырьках, но не на плазматической мембране. AQP6 – это не простой водный канал. При экспрессии в ооцитах *Xenopus laevis* AQP6 находится в плазматической мембране ооцита, где он проявляет минимальную проницаемость для воды. Обработка ооцитов AQP6 хлоридом ртути не приводила к снижению водопроницаемости, даже несмотря на то, что ингибирование водопроницаемости ранее было показано для других аквапоринов [120]. Было обнаружено, что низкие концентрации хлорида ртути увеличивают водопроницаемость и индуцируют сопутствующий мембранный ток. Таким образом, хотя первичная последовательность AQP6 наиболее близка к AQP2 и AQP5 (оба ингибируются хлоридом ртути), структура AQP6 должна содержать функционально важные различия. Расположение AQP6 во внутриклеточных пузырьках, также содержащих H^+ -АТФазы, предполагает участие его в секреции кислоты. Важно отметить, что ионные токи AQP6 быстро и обратимо активируются при низких значениях pH, подтверждая, что AQP6 может участвовать в секреции кислоты α -вставочными клетками. Исследование крыс, подвергшихся хроническому ацидозу, не выявило изменений в экспрессии AQP6, но хронический алкалоз и водная нагрузка привели к значительному увеличению экспрессии AQP6. В настоящее время считается, что AQP6 может быть связан с некоторыми формами кислотно-щелочных нарушений, так как экспрессия AQP6 в почках повышается в ответ на хронический метаболический алкалоз или повышенное потребление воды [151].

Мембранный обменник TAUT (ген *slc6ab*) совместно переносит 2 иона Na^+ и 1 ион Cl^- с аминокислотным субстратом, таким как таурин (который не имеет карбоксильной группы и, следовательно, не является аминокислотой), и β -аланин, с высоким сродством. TAUT широко экспрессируется в организме в почках, кишечнике, сетчатке, головном мозге, печени, мышцах и плаценте. TAUT в почках экспрессируется в медуллярном слое, локализован на апикальных мембранах в медуллярной собирательной трубке. TAUT реагирует на солевую нагрузку увеличением экспрессии, что приводит к увеличению концентрации таурина в медуллярных клетках [84]. Нокаут гена TAUT (Tau $-/-$) приводит к тяжелой дегенерации сетчатки и значительному снижению концентрации таурина в плазме, почках, печени и глазах у мышей. Кроме того, у нокаутов снижается способность к деторождению, а также снижается их общая работоспособность [121]. В почке дефицит TAUT приводит к значительной потере таурина почками и после-

дующей гипотауринемии у мышей. Параллельно с потерей таурина почками, концентрация мочевины в плазме заметно увеличивается у мышей с нокаутом TAUT. Способность мышей без TAUT концентрировать или разбавлять мочу при водной депривации или однократной водной нагрузке, соответственно, остается неизменной. Однако после 36-часовой депривации воды наблюдается значительно более высокая осмоляльность плазмы, увеличение концентрации K^+ и мочевины указывают на изменения функции почек и гомеостаза жидкости. Постоянная концентрация мочевины и стойкое повышение активности вазопрессинной системы, появляющееся при свободном доступе к воде после периода обезвоживания, указывают на участие TAUT в механизмах, необходимых для подавления высвобождения вазопрессина для нормализации осмоляльности плазмы. Такая роль TAUT может также объяснить наблюдение, при котором диуретический ответ на пероральную водную нагрузку значительно задерживался у TAUT^{-/-} мышей по сравнению с TAUT^{+/+}. Напротив, повторяющаяся фармакологическая блокада рецептора вазопрессина V_2 вызвала сходные диуретические реакции у обоих генотипов [57].

Почки играют важную роль в гомеостазе глюкозы, участвуя в глюконеогенезе, утилизации глюкозы и реабсорбции глюкозы из почечного клубочкового фильтрата. После ночного голодания 20-25 % глюкозы, попадающей в кровоток, поступает из почек в результате глюконеогенеза. Затем, почки утилизируют около 10 % всей глюкозы, потребляемой организмом. Каждый день почки фильтруют около 180 г глюкозы, и практически все это реабсорбируется в кровоток. Гормоны (в первую очередь инсулин и катехоламины), субстраты, ферменты и переносчики глюкозы - вот некоторые из различных факторов, влияющих на функционирование почек [58]. Примерно 90 % глюкозы реабсорбируется SGLT2, высокопроизводительным транспортером глюкозы, расположенным на поверхности эпителиальных клеток, выстилающих проксимальный каналец нефрона. Транспорт натрия и глюкозы через этот транспортер происходит в соотношении 1:1 [16]. Оставшиеся 10 % реабсорбции глюкозы происходит через SGLT1, высокоаффинный переносчик глюкозы/галактозы с соотношением связывания натрий: глюкоза 2:1. Глюкоза, реабсорбированная SGLT, затем высвобождается в кровоток за счет действия облегчающих переносчиков глюкозы (GLUT) на базолатеральной мембране эпителиальных клеток, выстилающих проксимальные каналцы. Хроническая гипергликемия усиливает экспрессию и активность почечного SGLT2, при этом инсулин является физиологическим агонистом этого эффекта. Инсулин также подавляет высвобождение глюкозы почками напрямую, ингибируя глюконеогенез, и косвенно, уменьшая доступность глюконеогенных предшественников. Катехоламины, с другой стороны, имеют противоположный эффект на почечный глюконеогенез. Глюкагон не оказывает прямого влияния на метаболизм глюкозы в почках [199].

1.5. Рецепторные тирозинкиназы

Протеин-тирозинкиназы представляют собой большое и разнообразное семейство генов, встречающихся только у животных. Их основные функции включают регуляцию многих аспектов передачи сигналов многоклеточных организмов. Межклеточные взаимодействия, регулирующие рост клеток, процессы их дифференцировки, адгезии, подвижности и смерти часто регулируются с помощью тирозинкиназ. Было показано, что у людей тирозинкиназы играют важную роль в развитии многих патологических состояний, включая диабет и рак. Исторически, гены тирозинкиназ являются классом онкогенов, участвующих в большинстве форм злокачественных опухолей человека. Гены тирозинкиназ также связаны с широким разнообразием врожденных синдромов [155]. Тирозинкиназы содержат высококонсервативные каталитические домены, сходные с таковыми в белковых серин/треониновых и киназах двойной специфичности, но с уникальными мотивами субдоменов, которые четко идентифицируют участников как тирозинкиназы. Высокая степень консервативности мотивов тирозинкиназ позволила идентифицировать гены тирозинкиназ в большинстве типов животных [85]. В дальнейшем речь пойдет о тирозинкиназах, выполняющих функцию рецептора, иначе называемые рецепторные тирозинкиназы (RTK, receptor tyrosine kinase). Геном человека содержит 90 генов тирозинкиназ и пять предполагаемых псевдогенов тирозинкиназ. Из 90 генов тирозинкиназ 58 относятся к рецепторным тирозинкиназам, которые определяют с помощью структуры трансмембранного домена. Эти 58 рецепторных тирозинкиназ могут быть сгруппированы в 20 подсемейств на основе последовательности киназного домена [157].

Почти все RTK имеют общую молекулярную структуру, состоящую из внеклеточного лиганд-связывающего эктодомена, одиночной трансмембранной спирали и внутриклеточной области, состоящей из гибкого околосмембранного домена, за которым следуют домен протеинкиназы и C-концевая область. Общая топология RTK, их механизм активации и ключевые компоненты внутриклеточных сигнальных путей, которые они запускают, высоко консервативны. Структурные изменения в эволюции от нематоды *Caenorhabditis elegans* до человека, наблюдали несущественные изменения, что согласуется с ключевыми регуляторными ролями, которые играют рецепторные тирозинкиназы. Кроме того, многочисленные заболевания возникают в результате генетических изменений или аномалий, которые изменяют активность, численность, клеточное распределение или регуляцию RTK. Мутации в RTK, и aberrантная активация их внутриклеточных сигнальных путей были причинно связаны с раковыми заболеваниями, диабетом, воспалением, тяжелыми заболеваниями костей, атеросклерозом и ангиогенезом. Эти связи привели к разработке лекарств нового поколения, которые блокируют или ослабляют активность RTK [109]. При разработке подобных лекарств использовался мутационный анализ, который показал важную роль остатков фосфотирозина в участках активированных рецепторов, они

являются сигналом для разных рецептор-связывающих белков. Следовательно, одна из основных функций фосфорилирования тирозина заключается в обеспечении основы, на которой различные внутриклеточные сигнальные белки могут обратимо собираться на плазматической мембране. Специфичность этой сборки определяется сродством различных доменов к своим родственным пептидным лигандам. Открытие и детальное исследование рецепторных тирозинкиназ привело к разработке большого количества новых противоопухолевых лекарств таких, как низкомолекулярные ингибиторы доменов киназы и моноклональные антитела, направленные против внеклеточных доменов рецепторных тирозинкиназ. Первые серьезные терапевтические успехи, основанные на знаниях об активации онкогена при раке человека, привели к появлению препаратов Герцептин и Гливек, которые являются плодами длительной работы [114]. В целом, существует четыре варианта димеризации РТК, которые приводят к активации тирозинкиназного домена. В первом варианте димеризация рецептора полностью лиганд-зависимая, без какого-либо прямого контакта между внеклеточными областями двух рецепторов, как, например, в случае TrkA (рецептор фактора роста нейронов) [193]. Во втором варианте димеризация полностью зависит от рецептора без какого-либо взаимодействия между двумя активирующими лигандами, как в случае членов семейства ErbB (EGFR, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 и HER4/ErbB4) [209]. В третьем варианте гомодимеры лиганда связываются с двумя молекулами рецептора, которые затем взаимодействуют друг с другом через границу димера, как, например, в случае KIT (рецептор фактора стволовых клеток) [204]. В четвертом варианте в дополнение к комбинации двухвалентного связывания лиганда и прямых контактов рецептор-рецептор, в димеризации рецептора также участвуют вспомогательные молекулы. Например, семейство FGFR использует гепарин или гепарансульфат в качестве вспомогательных молекул в этом случае [58]. Примечательно, что часть РТК образует димеры или олигомеры высокого порядка даже без активации лигандов. Рецепторы остаются в динамическом равновесии между мономерами и димерами. Для EGFR и многих других РТК основным состоянием перед связыванием лиганда является мономер. Однако, для семейства рецептора инсулина (IR) характерно образовывать димеры даже в отсутствии лигандов. Предварительно сформированные димеры существуют в неактивной или активной форме. Неактивные димеры, вероятно, находятся в динамическом равновесии с активными димерами. Активный димер будет стабилизирован связыванием лиганда, тогда как неактивный димер будет активирован связыванием лиганда посредством конформационных изменений. В обоих случаях, связывание лиганда сместит равновесие к образованию лиганд-зависимой димеризации [172].

1.6. Рецепторные тирозинкиназы как сенсоры рН

Рецептор IRR – первая рецепторная тирозинкиназа, описанная как сенсор рН. IRR является рецепторной тирозинкиназой и принадлежит к мини-семейству инсулинового рецептора, в

которое также входят инсулиновый рецептор и рецептор инсулиноподобного фактора роста. кДНК рецептора IRR была клонирована в 1989 г., однако долгое время не могли обнаружить его природных агонистов пептидной или белковой природы, считая этот рецептор сиротским [1].

Открытие IRR было основано на ранее открытых и клонированных рецепторах IR и IGF-IR [147]. ДНК IR человека использовали для выделения IR-подобных последовательностей из геномной библиотеки морской свинки, которые были использованы для клонирования гена *insrr* человека. Общая организация гена *insrr* оказалась аналогична человеческому *insR*, в то время как выравнивание предсказанных белковых последовательностей IRR, IR и IGF-IR показало их высокую степень гомологии между собой (приблизительно 50% идентичности для IR и около 54% идентичности для IGF-IR). Гомология эктодомена IRR по сравнению с эктодоменом IR или IGF-IR несколько меньше - 49% или 52%, соответственно.

Большинство гипотез о потенциальном механизме активации рецептора IRR были сформулированы на базе исследования IR, IGF-IR и других рецепторных тирозинкиназ. Все три рецептора имеют одинаковую доменную структуру. Они имеют один трансмембранный домен, N-концевую внеклеточную область и C-концевую внутриклеточную область. В пределах внутриклеточной области находится каталитический домен, способный фосфорилировать тирозин, что характерно для всех РТК. Во внеклеточной области все три рецептора эндогенно протеолизуются, но остаются в виде комплексов α - и β -субъединиц, связанных дисульфидными мостиками. При SDS-электрофорезе, α -(только внеклеточная) и β -(внеклеточная, трансмембранная и внутриклеточная)-субъединицы рецептора IRR мигрируют как полосы массой 120 и 66 кДа соответственно.

Физиологическая роль рецептора IRR до недавнего времени была неизвестна, так как попытки найти природный лиганд рецептора белковой или пептидной природы были безуспешными. В результате экспериментов по поиску эндогенного лиганда IRR было установлено, что IRR может напрямую активироваться слабощелочной внеклеточной средой [44, 46], что разительно отличает рецептор от других рецепторных тирозинкиназ, которые имеют лиганды белковой или пептидной природы. Активация IRR щелочной средой специфична, дозозависима, а также обуславливается конформационными изменениями во внеклеточной части рецептора при повышении pH внеклеточной среды. Более того, в отличие от гомологичных IR и IGF-IR активация IRR происходит с положительной кооперативностью (коэффициент Хилла около 3) [46], тогда как при активации инсулином и инсулиноподобным фактором роста соответствующих рецепторов наблюдается отрицательная кооперативность. Это свидетельствует о многоточечном механизме конформационных изменений в эктодоме IRR в ответ на повышение pH.

Генноинженерные эксперименты свидетельствуют о том, что в ответ на повышение рН во внеклеточной части рецептора происходит конформационная перестройка за счет параллельных взаимоусиливающих изменений в разных доменах, а не за счет точечного изменения заряда в отдельном аминокислотном остатке или микродомене [4]. По-видимому, активация IRR включает два отдельных рН-зависимых центра в эктодомене рецептора, которые действуют совместно, индуцируя конформационные изменения в молекуле IRR, приводящие к автофосфорилированию внутриклеточных киназных доменов рецептора [49]. Функцию IRR как сенсора щелочной внеклеточной среды подтверждают физиологические эксперименты. У мышей с направленной инактивацией гена *insrr*, кодирующего рецептор IRR, наблюдалось нарушение регуляции кислотно-щелочного равновесия. У мышей индуцировали алкалоз добавлением 0,28 М NaHCO_3 в питьевую воду. Контрольную группу мышей поили водой с добавлением 0,28 М NaCl . У мышей, нокаутных по гену *insrr*, щелочная нагрузка на организм сопровождалась метаболическим алкалозом и пониженной секрецией бикарбоната в мочу [46]. Анализ параметров крови показал, что у мышей с нокаутом гена *insrr* содержание бикарбоната в крови (22.9 ± 1.0 против 19.9 ± 1.6 , $p < 0.05$), а также рН (7.29 ± 0.02 против 7.21 ± 0.03 , $p < 0.05$) и гематокрит (54 ± 1.1 против 50 ± 1.0 , $p < 0.05$) были выше, чем у животных дикого типа. Остальные параметры крови практически не отличались. Также параметры крови определяли в условиях метаболического алкалоза, который индуцировали внутривенным введением 1.3 % раствора NaHCO_3 (200 мкл/10 г веса мыши). Через 5 мин после инъекции щелочного раствора динамика изменения концентрации бикарбоната и рН крови у мышей с нокаутом IRR была такой же, как и у мышей дикого типа, т.е. наблюдалось повышение рН, а также содержание бикарбоната. У мышей обеих групп через 15 мин после индукции алкалоза рН крови стал несколько ниже, однако у мышей с нокаутом IRR через 15 мин отмечено существенное повышение содержания бикарбоната и концентрации CO_2 в крови по сравнению с мышами дикого типа. Таким образом, животные дикого типа и с нокаутом гена *insrr* по-разному реагировали на острый экспериментальный алкалоз, вызванный введением бикарбоната в кровь.

Обработка клеток, экспрессирующих рецептор IRR, щелочью вызывает активацию внутриклеточных сигнальных белков, отчасти схожих с белками, которые активируются при обработке клеток инсулином. При активации IRR наблюдается фосфорилирование IRS-1 и протеинкиназы В (Akt/PKB). ERK 1,2 активируются при повышении рН [80]. Также была показана активация щелочной средой эндогенного рецептора IRR в клетках поджелудочной железы MIN6, которая блокировалась добавлением ингибитора киназной активности linsitinib, специфичного ко всем трем членам семейства рецептора инсулина. Активация IRR в клетках MIN6 вызывала также рН-зависимую активацию внутриклеточного сигнального белка IRS-1. При обработке щелочью клеток MIN6 не было обнаружено изменение фосфорилирования внутриклеточных

сигнальных белков Akt и ERK 1,2 [50]. В отличие от своих близких гомологов рецепторов IR и IGF-IR, которые экспрессируются в широком спектре тканей и клеток, экспрессия IRR специфична, рецептор обнаруживается в некоторых органах, в определенных типах клеток. Наибольшее количество IRR было обнаружено в почке, где IRR экспрессируется в β -вставочных клетках, клетках, выстилающих дистальные каналцы, которые секретируют бикарбонат. В меньших концентрациях мРНК IRR была обнаружена в мозге, желудке, поджелудочной железе [147].

В нервной системе мРНК IRR обнаружена в сенсорных и симпатических нейронах, где IRR коэкспрессируется с тирозинкиназным рецептором фактора роста нервов (NGF) TrkA. Экспрессия IRR и TrkA появляется на перинатальной стадии развития в базальных нейронах переднего мозга, причем мРНК обоих рецепторов обнаруживается в развивающейся нервной системе только совместно [153, 154]. Также имеются данные об экспрессии IRR в холинергических нейронах переднего мозга, где также наблюдается коэкспрессия с рецептором TrkA. Кроме того, IRR был обнаружен в нейробластомах, где рецептор коэкспрессируется с IGF-IR, TrkA и рецептором p75-нейротрофина. При коэкспрессии с IGF-IR, IRR был связан с увеличенным индексом апоптоза. Экспрессия IRR значительно коррелировала с благоприятным прогнозом в случае нейробластомы [192]. Также экспрессия IRR была показана в нейронах спинномозговых ганглиев мышей с использованием метода РНК-секвенирования отдельных клеток, причем в этих же клетках наблюдается высокий уровень экспрессии рецептора TrkA [85]. С использованием метода RT-PCR (reverse transcription PCR) была показана экспрессия рецептора IRR, а также других членов семейства IR и IGF-IR, в одноклеточных эмбрионах мыши и бластоцистах, что предполагает роль рецептора в развитии организма. Так как IRR и TrkA располагаются рядом на хромосоме и имеют общие регуляторные элементы, расположенные между этими двумя генами, было предположено, что IRR не играет специфической роли в нервной системе, и его присутствие определяется только экспрессией TrkA [119]. Внеклеточный pH в нервных тканях обычно не превышает 7,8, что предотвращает активацию IRR. Таким образом, коэкспрессия IRR с TrkA, возможно, не была устранена в ходе эволюционного развития. Тем не менее, значительные изменения внеклеточного pH в нервной ткани происходят как во время нормального физиологического функционирования, так и при патологических состояниях, таких как эпилепсия, инсульт, диабет и др. Алкалоз, возникающий при патологии, как известно, оказывает глубокое воздействие на нейрональную активность и выживаемость. Значительный алкалоз в тканях периферической или центральной нервной системы может наблюдаться во время гипогликемии, ишемии или почечной недостаточности. Например, алкалоз тканей является одним из отличительных признаков повреждения головного мозга, вызванного гипогликемией [13]. Сигнальные пути TrkA-NGF играют центральную роль в процессах нейронального выживания и

развития. Рецептор IGF-IR, близкий родственник IRR, обладает схожими внутриклеточными механизмами передачи сигнала. Установлена существенная роль IGF-IR в выживании и антиапоптозной передаче сигнала во многих типах клеток, как нормальных, так и злокачественных [185]. Было показано, что IGF-IR способствует восстановлению мозга от повреждений, вызванных гипоксией-ишемией, предотвращая активацию запрограммированных путей клеточной гибели нейронов. Можно предположить, что одной из функций IRR является нейропротекторная передача сигнала, способствующая выживанию клетки, в ответ на острый алкалоз нервных тканей в результате патофизиологических состояний. У мышей, нокаутных по гену IRR, обнаружен поведенческий фенотип, заключающийся в дефиците агрессивно-оборонительного поведения животных [211]. Насколько данный фенотип связан с функцией IRR в качестве физиологического сенсора pH, остается предметом изучения.

2. Материалы и методы

2.1. Получение однопометных мышей, анализ мышей с нокаутом гена *insrr*

При работе с животными моделями, мышей обычно подвергают обратному скрещиванию в большом количестве поколений на определенную линию (обычно C57Bl/6), и в качестве контроля чаще всего используют дикий тип той же линии. Однако эти типы экспериментов имеют значительный недостаток, так как нет четких правил, как их проводить и обрабатывать полученные результаты. В итоге могут быть сделаны неправильные выводы, что не позволяет обнаружить истинные эффекты влияния нокаута. Использование однопометных мышей-литтермейтсов обеспечит сопоставимость не только генетического фона, но и окружающей среды. Другое преимущество состоит в том, что мыши не требуют полного обратного скрещивания, так как различия в генах будут нейтрализованы при сравнении однопометных мышей. Эксперименты без использования литтермейтсов могут быть только на линиях мышей, которые являются генетически идентичными. Однако в этих случаях все же необходимо контролировать эксперименты с учетом факторов окружающей среды [90].

Мыши с нокаутом *insrr*^{-/-} были получены на основе линии мышей C57Bl/6J [98]. Затем, в филиале ИБХ работали со спермой нокаутных мышей, которая была подвергнута криоконсервации [134]. После разморозки и оплодотворения мышей линии C57Bl/6 было проведено несколько циклов разведения с последующим генотипированием. Была получена линия IRR^{-/-} со статусом без специфических патогенов (SPF) с чистым генетическим фоном C57Bl/6. Для поддержания этого фона и минимизации эффекта накопления мутаций, был использован метод разведения мышей-литтермейтсов (littermates), или однопометных мышей. Дикая и нокаутная мышь дают гетерозиготное потомство, которое скрещивается между собой, так как линия C57Bl/6 инбредная линия, получают однопометные мыши. Затем потомки гетерозигот одного поколения – гомозиготный дикий тип, гетерозиготы и гомозиготный нокаутный тип, в соотношении 1:2:1, были генотипированы и использованы для дальнейших экспериментов.

Общее количество животных, взятых в эксперимент отражено в таблице.

Таблица 2. Количество экспериментальных животных

Генотип	Нормальные условия	Бикарбонатная нагрузка
Дикий тип	28	29
Нокаут IRR -/-	25	26

2.2. Этические аспекты исследования

Эксперименты над животными проведены в соответствии с рекомендациями ARRIVE Guidelines [145]. 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.

2.3. Генотипирование

Для генотипирования мышей использовали метод ПЦР, в качестве матрицы для которого брали геномную ДНК. Для того, чтобы выделить геномную ДНК из тканей (части хвостов и ушей), использовали буфер с протеиназой К – 200 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl, 20 мМ ЭДТА, 0,4 % SDS, 0,4 мг/мл протеиназы К. Кусочки тканей инкубировали при 55 °С в течение 3 часов, периодически встряхивая на вортексе, затем фермент инактивировали при 70 °С в течение 5 минут. После этого осадок из тканей осаждали центрифугированием при 5000 rpm в течение 10 минут. Супернатант отбирали, добавляли 1 объем изопропанол и центрифугировали при 12000g 10 минут. Осадок промывали 70 % этанолом, подсушивали и растворяли в воде для измерения концентрации ДНК. Эту ДНК использовали как матрицу для ПЦР на дикую и нокаутную аллель, в качестве праймеров для нокаутной аллели использовали праймеры KO_irr1_new и KO_irr2_new; для дикой аллели – mWT3_new и mWT4_new. Каждый образец геномной ДНК ставили с каждой парой праймеров и тремя контролями (вода, известная WT, известная KO). Параметры реакции: 32 цикла, предварительная денатурация 95 °С 3 мин 30 сек, денатурация 95 °С 45 сек, отжиг 60 °С 45 сек, элонгация 72 °С 30 сек, финальная достройка 72 °С 7 мин. Продукт ПЦР около 300 пар оснований детектировали на агарозном фореze при концентрации агарозы 2%. Для приготовления геля использовали ТАЕ-буфер (40 мМ Tris-base; 20 мМ CH₃COOH, 1 мМ ЭДТА). Агарозу кипятили в ТАЕ-буфере, добавляли бромистый этидий, результаты детектировали под УФ-излучением на трансиллюминаторе Vilber Lourmat.

Последовательности праймеров для генотипирования:

- mwt3_new 5'-GCAAGCTACACAGGCTCGAGGG-3'
- mwt4_new 5'-TGGGTTCTGATCCTCTCAAGGAG-3'
- KO_irr2_new 5'-CAAAACCAAATTAAGGGCCAGCTC-3'
- KO_irr1_new 5'-AGCCTGAAGACCCTCGTCGACT-3'

2.4. Условия щелочной нагрузки, извлечение органов, подготовка образцов

Лабораторные животные содержались в виварии Института Биоорганической Химии, со свободным доступом к еде и питью, соотношение светлого и темного времени суток 1:1 (12 ч). Для эксперимента были взяты два генотипа животных – дикий тип и нокаут IRR^{-/-} в двух условиях. При нормальных условиях в качестве питья мышам давали обычную воду, а при условиях щелочной нагрузки в воду для питья мышей добавляли бикарбонат натрия NaHCO₃ в концентрации 250 мМ (рН=8,5). Таким образом, были сформированы 4 группы животных, n = 4, всего 16 животных. Эти группы и количество животных повторялось в разных методах: гистологическое строение, высокопроизводительное секвенирование, ПЦР в реальном времени, а так же MEA-тест Дикий тип в нормальных условиях (WT_water), нокаутные животные в нормальных условиях (KO_water), дикий тип в условиях щелочной нагрузки (WT_bicarb), нокаутные животные в условиях щелочной нагрузки (KO_bicarb). Щелочная нагрузка проводилась в течение 7 дней, перед извлечением органов за 12 часов у мышей убиралась пища, но не питье, для выравнивания метаболического уровня животных. В эксперимент брали самок одного возраста, 3-4 мес. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с протоколом комитета по уходу и использованию животных (IACUC, Institutional Animal Care and Use Committee), утвержденным Комиссией по биоэтике Института биоорганической химии им. Шенкина–Овчинникова РАН (ИБХ РАН).

При выделении органов, животных усыпляли с помощью анестезирующих препаратов, золетил 20 мг/кг, ксилазин 5 мг/кг в 0,9 % растворе NaCl. Затем эвтаназировали методом цервикальной дислокации. Почку извлекали из брюшной полости, промывали в стерильном растворе PBS и далее, в зависимости от цели эксперимента, обрабатывали соответствующим способом. Для РНК-секвенирования (см. ниже) вырезали сегмент почки толщиной 3 мм из срединного отдела по горизонтальной плоскости, эту часть почки помещали в буфер RNeasy lysis buffer. Для получения кДНК (см. ниже) почку разрезали по горизонтальной плоскости на две части, помещали в раствор TRIzol Reagent (Thermo Scientific), затем гомогенизировали на керамических шариках Lysing matrix D (MP Biomedicals) с помощью настольной системы лизиса с взбиванием шариков FastPrep-24 classic (MP Biomedicals). Таким же способом готовили образцы почек для приготовления белковых лизатов (см. ниже).

2.5. Обзорное окрашивание гематоксилином и эозином

Для определения влияния инактивации гена рецепторной тирозинкиназы IRR на строение почек было проведено обзорное окрашивание гематоксилином и эозином криосрезов почек мышей [71]. Для визуализации гистологического строения почки, подготовили ткань почки для изучения, сделав тонкие срезы толщиной около 5-10 мкм с помощью криотома Leica CM-

1050 (Leica Microsystems, Germany), фиксировали срезы образцов в 10% нейтральном формалине, затем окрашивали 1% раствором гематоксилина в течение 5-10 минут, отмывали водой и окрашивали раствором эозина в течение 1-2 минут. Проводили срезы через ряд этанолов различных концентраций (70%, 80%, 95%, 100%) для дегидратации, затем в ксилоле для просветления и заключали CV Mount (Leica Microsystems, Germany). Подготовленные срезы анализировали с использованием микроскопа Leica DMI8 (Leica Microsystems, Germany).

2.6. Иммуногистохимический анализ

Для иммуногистохимического исследования мышей анестезировали зоветилом (20 мг/кг массы тела) и ксилазином (5 мг/кг массы тела) в 0,9% растворе NaCl. Каждый эксперимент включал по четыре мыши на группу. Затем почки мышей перфузировали 4% раствором параформальдегида (разбавленным в PBS) через брюшную аорту. После фиксации в течение 10 минут почки удаляли и промывали в PBS. Блоки почек замораживали в изопентане, охлажденном жидким азотом, и хранили при -80°C . Подсчет вставочных клеток проводили по методике, описанной в [131] с использованием тройного флуоресцентного иммуноокрашивания. Срезы почек толщиной 5 мкм получали с использованием криостата Leica CM3050S. Срезы почек блокировали в PBS, содержащем 0,05 % БСА, 5 % нормальной козьей сыворотки, 5 % ослиной сыворотки, в течение 2 ч с последующей инкубацией в течение ночи во влажной камере при 4°C с первичными антителами (антитела морской свинки к AE1 1:2000), кроличий анти-пендрин 1:10000, куриные анти-Е-субъединица H⁺-АТФазы 1:500) (антитела производства Cell Signaling Technology, USA), разведенные в PBS, содержащем 0,05% BSA. Срезы трижды промывали PBS и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте с соответствующими вторичными антителами (козьи анти-кроличьи Alexa555 (1:2000), ослиные анти-морские свинки Cy5 (1:500), козьи анти-куриные Alexa488 (1:800) (антитела производства Invitrogen, USA) и DAPI (1:1000)). Срезы снова трижды промывали PBS, а затем помещали в Glycergel Mounting Medium (Dako).

Для визуализации макрофагов на срезах почек так же инкубировали срезы в 0,05% БСА, в течение 2 ч с последующей инкубацией в течение ночи во влажной камере при 4°C с первичными антителами CD86 1:500 (Abcam, UK) и CD206 1:500 (Abcam, UK). Затем инкубировали со вторичными антителами анти-кроличьи, конъюгированные с FITC (1:100) и DAPI (1:1000). Срезы снова трижды промывали PBS, а затем помещали в Glycergel Mounting Medium (Dako).

2.7. Морфометрия срезов почек

Подсчет различных типов вставочных клеток, определение площади почечного тельца, толщины коркового и мозгового вещества с помощью программы Image Scope M (СМА, Россия). Цифровые изображения гистологических срезов почечной ткани загружали в программу,

используя инструменты программы Image Scope M, проводили анализ срезов почек мышей. Для подсчета вставочных клеток для каждой из четырех мышей в группе получали двенадцать случайных снимков коркового вещества почек и внутренней полосы наружного мозгового вещества. Клетки с базолатеральной экспрессией AE1 считали вставочными клетками типа А, клетки с апикальной экспрессией пендрин считали вставочными клетками типа В. Соотношение вставочных клеток типа А и В выражали в процентах от общего числа подсчитанных клеток, принятого за 100 %. Полученные данные подвергали статистической обработке с помощью программы Prism 8 (GraphPad Software).

2.8. РНК-секвенирование почек мышей

Было проведено глубокое NGS-секвенирование, срез почки помещали в буфер RNAlater и передавали для дальнейшего исследования в ЗАО «Геноаналитика» (Россия, Москва). Секвенирование проводили на приборе Illumina HiSeq 2500. Считывания RNA-Seq были сопоставлены с эталонным геномом мыши (mm10) с помощью STAR [56]. Для количественной оценки уровней экспрессии всех аннотированных генов использовались считывания с уникальным картированием (Ensembl v.92). Количество общих генов было нормализовано до CPM (количество на миллион) с помощью EdgeR [158]. Анализ дифференциальной экспрессии также выполняли с использованием EdgeR.

Необработанные данные секвенирования РНК были депонированы в Европейский архив нуклеотидов под номером GSE200638 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE200638>). Прочтения RNA-Seq были картированы с эталонным геномом мыши (mm10) с использованием STAR [Dobin et al., 2013]. Уникальные считывания картирования (Ensembl v. 92) использовали для количественной оценки уровней экспрессии всех аннотированных генов. Количество общих генов нормализовали к CPM (количество на миллион) с помощью EdgeR [Robinson, McCarthy, Smyth, 2010]. Анализ дифференциальной экспрессии также проводили с помощью EdgeR. РНК-секвенирование контролировали качественно и количественно с помощью инструмента селективного выравнивания salmon с непочечной библиотекой и параметрами --validateMappings и --seqBias с использованием всего эталонного генома Mus musculus (GRCm39, GENCODE M27) в качестве референсной последовательности [64, 143]. Множественные полученные значения были обработаны с помощью пакета edgeR. [124, 158], смещения рассчитывались с помощью tximport [171]. Только белок-кодирующие гены учитывались в анализе, в соответствии с BioMart [169] <https://www.zotero.org/google-docs/?QnkCl0>. Транскрипты, экспрессированные менее чем в 25% образцов или имеющие менее 10 прочтений в каждом образце или общее количество прочтений менее 100, отфильтровывали. После всех этих шагов фильтрации наш набор данных содержал 13430 генов. Генетически дифференциальный анализ экспрессии (DE) был выполнен

с использованием F-критерия edgeR (QL F-тест) в отрицательном биномиальном обобщенном логарифмически-линейном режиме 1. Испытание проводили либо между нокаутными и контрольными образцами (отдельно для разных обработок), либо между образцами мышей, получавших бикарбонат и воду (отдельно для нокаутированных мышей и мышей дикого типа). Однако количество значимых нокаут-зависимых генов было относительно велико, и их было трудно анализировать, не устанавливая произвольный порог значимости. Поэтому были выбраны два других подхода: быстрый анализ обогащения набора генов (fgsea) [99] и взвешенный анализ сети коэкспрессии генов (WGCNA) [105]. Анализ обогащения набора генов Gene Ontology (GO fgsea), основанный на логарифмическом изменении (logFC) между образцами с нокаутом IRR и образцами дикого типа в нормальных условиях, показал, что нокаут вызывает изменения в экспрессии генов, связанных с цепью переноса электронов и некоторыми другими процессами. Анализ fgsea был выполнен на основе изменения журнала (logFC) с использованием пакета clusterProfiler R [203]. Используя edgeR, получили матрицу операций чтения на килобазу на миллион (RPKM). Она использовалась для анализа основных компонентов (PCA) и для WGCNA. Чтобы построить сеть при выполнении WGCNA, использовали двух взвешенную среднюю корреляцию для и мощность мягкого порога 14. Иерархическая кластеризация дерева была выполнена на топологической матрице перекрытия с параметрами deepSplit = 1 и minClusterSize = 20 и рассчитывались собственные гены модуля. Для оценки того, насколько модули генов соответствуют группам выборки, использовали линейную регрессию со следующими независимыми переменными: генотип (КО или WT), лечение (бикарбонат или вода) и их взаимодействие. Затем, выбрали гены из модулей, которые оказались сцепленными с нокаутом IRR, и выполнили кластерный профилировщик Gene Ontology [32] анализ сверх представленности тех из них, у которых коэффициент корреляции Пирсона с собственным геном модуля был больше 0,8 и FDR QL F-критерия между КО и WT меньше 0,05 как при бикарбонатной нагрузке, так и в нормальных условиях.

2.9. Выделение РНК, получение кДНК

РНК из почек выделяли согласно протоколу производителя реагента TRIzol (Thermo Scientific), для этого образцы ткани почки лизировали в 1 мл TRIzol Reagent, затем центрифугировали при 12000g (4 °C) в течение 5 минут, после этого супернатант переносили в чистую пробирку и добавляли 0,2 мл хлороформа. После инкубации 10-15 минут повторно центрифугировали образцы при 12000g (4°C) в течение 15 минут, отбирали верхнюю водную фазу в чистые пробирки. Добавляли 0,5 мл изопропанола, инкубировали 10 минут, центрифугировали образцы 12000g (4°C) в течение 15 минут. Осадок промывали 75 % этанолом, затем подсушивали и растворяли в воде. Целостность выделенной РНК осуществляли с использованием электрофореза на агарозном геле 2 % в буфере TBE (Tris-borate-EDTA) по наличию четких полос 28S и 18S

РНК. Также измеряли концентрацию РНК на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer-basic при длине волны 260 нм. Все полученные образцы РНК обрабатывали ферментом ДНКазой I, входящей в состав набора DNaseI kit (Thermo Scientific) в течение 30 минут при 37 °С. После этого заново измеряли концентрацию РНК и повторно проверяли на агарозном геле. Обработанную ДНКазой РНК использовали для построения цепи комплементарной ДНК (кДНК) с помощью набора, содержащую обратную транскриптазу, RevertAid kit (Thermo Scientific). Состав реакционной смеси: РНК 5 мкг, обратная транскриптаза RevertAid, ингибитор РНКазы RiboLock, буфер реакции 1X, смесь dNTP, праймер Random Hexamer. Синтез кДНК проводили в течение 90 минут при температуре 42 °С, затем использовали ее в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени.

2.10. ПЦР в реальном времени

Количественная ПЦР в реальном времени проводилась на матрице кДНК из почек мышей, в качестве зондов использовали пробы TaqMan, синтезированные компаниями Lumiprobe и ЕвроГен (Москва, Россия). К выбранным генам подбирали праймеры и зонды с флуоресцентной меткой. В качестве программ для дизайна праймеров использовали программы GeneRunner, OligoExplorer, OligoAnalyzer. В качестве референсного гена использовали ген *ap3d1*, подобранный с помощью литературных данных [89]. Праймеры и зонды представлены в таблице. ПЦР в реальном времени проводили на приборе DPrime фирмы ДНК-технология (Россия, Москва). Параметры реакции: 45 циклов, предварительная денатурация 95 °С 5 мин, денатурация 95 °С 15 сек, отжиг 60 °С 45 сек, хранение 10 °С. Нормализованная относительно референсного гена экспрессия рассчитывалась по протоколу, описанному в [149]. Расчёты проводили с помощью Microsoft Excel, затем графическое отображение результатов количественной ПЦР осуществляли с использованием GraphPad Prism 8.

2.11. Получение белковых лизатов и измерение концентрации белка

Для получения белковых лизатов почек, из животных извлекали органы (см. выше), гомогенизировали с использованием керамических шариков в бездетергентном буфере, содержащем Tris-HCl 100 мМ, коктейль ингибиторов (Sigma Aldrich), PMSF 1 мМ. Затем добавляли додецилсульфат натрия SDS до конечной концентрации 2 %. После инкубации при комнатной температуре в течение 30 минут, кипятили образцы 25 мин. Концентрацию белка определяли реагентом кумасси, Coomassie Protein Assay kit (Sigma Aldrich) по протоколу производителя, в качестве контроля использовали разведения стандартов бычьего сывороточного альбумина с известной концентрацией.

2.12. Анализ развития преимплантационных эмбрионов

Для выявления роли нокаута гена рецептора IRR в раннем эмбриональном развитии был проведен анализ развития эмбрионов мышей дикого типа и нокаутных по гену *insrr*, с использованием МЕА-теста. У самок мышей в возрасте 2-3 месяцев стимулировали суперовуляцию. После подсадки к самцам у самок извлекали яйцеводы, выделяя из них зиготы. Деление эмбрионов анализировали каждые сутки в течение 96 часов после извлечения с использованием микроскопа. Анализируя развитие эмбрионов дикого типа, наблюдали типичное деление бластомеров, спустя 24 ч образовывались двухклеточные эмбрионы, спустя 48 ч – четырехклеточные и т.д.

У самок мышей дикого типа и нокаутных по гену *insrr* в возрасте 2-3 мес. стимулировали суперовуляцию. Для стимуляции суперовуляции самкам мышей внутримышечно вводили поочередно гормональные препараты. Первая инъекция 5МЕ гонадотропного гормона сыворотки крови жеребых кобыл (ГСЖК) (препарат «Фоллимаг», ЗАО «Мосагроген», Россия), через 48 часов, 5МЕ гормона ХГЧ (препарат «Хорионический гонадотропин», ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия). Сразу после второй инъекции самок подсаживали на ночь к самцам, на следующее утро по копулятивной пробке определяли успешно спарившихся самок, которых отбирали в эксперимент. Животных усыпляли с помощью анестезирующих препаратов, золетил 15 мг/кг, ксилазин 5 мг/кг в 0,9 % растворе NaCl. Затем умерщвляли методом цервикальной дислокации.

У самок мышей извлекали яйцевод и вскрывали ампулы яйцевода в среде ЭКО1 «Ооклин» (ООО НПП «ПанЭко», Россия) в которой собирали ооцит-кумулюсные комплексы. Данные комплексы обрабатывали ферментативной средой ЭКО1 «Гиаза» (ООО НПП «ПанЭко», Россия) и продолжали отмывку ооцитов в среде ЭКО1 «Ооклин». Очищенные от клеток кумулюса ооциты помещали в каплю среды ЭКО ПРО «Дробление» (ООО НПП «ПанЭко», Россия), покрытую жидким парафиновым маслом. Эмбрионы культивировали в инкубаторе при условиях 5% CO₂ и температуре 37°C. Деление эмбрионов анализировали каждые сутки в течение 96 часов после извлечения зигот с использованием микроскопа. Оценку развития осуществляли с помощью индекса выхода бластоцист – процента образования бластоцист из общего количества извлеченных эмбрионов. МЕА тест проводили в трех повторах для каждого генотипа.

2.13. Вестерн блоттинг

Белковые лизаты анализировали методом Вестерн блоттинга, проводили электрофорез в 12 % ПААГ в денатурирующих условиях. После проводили перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану в течение 1,5 ч при постоянной силе тока 250 мА, в этанол-содержащем буфере. Для предотвращения неспецифического связывания белков мембрану инкубировали в буфере TBST (50 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 150 мМ NaCl, 0.05% Твин 20), содержащем 2 % бычьего сыво-

роточного альбумина в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем мембрану инкубировали с первичными антителами в течение ночи, для каждого антитела подбирали свою концентрацию. Далее отмывали буфером TBST мембрану от первичных антител, добавляли вторичные антитела козы против иммуноглобулинов IgG кролика или мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch). Затем мембраны обрабатывали раствором для детекции хемилюминесценции SuperSignal West Pico, сигналы детектировали на приборе Fusion Solo (Vilber Lourmat).

2.14. Статистическая обработка данных экспериментов

Результаты были представлены с использованием средних значений и стандартных отклонений (или стандартных ошибок среднего) либо медиан и перцентилей. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программного обеспечения Prism 8 (GraphPad Software, USA). Для проверки распределения данных на нормальность был использован тест Шапиро-Уилка. При нормальном распределении данных проводились парные сравнения с использованием t-теста Стьюдента. 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).

3. Результаты

3.1. Получение однопометных мышей и их генотипирование

Использование животной модели с нокаутом гена *insrr* позволит обнаружить взаимодействия этого рецептора с другими рН-чувствительными белками и изучить механизм регуляции кислотно-щелочного баланса в организме. Параллельно изучается влияние IRR на клеточном уровне, в этой работе внимание сконцентрировано на почке мыши, как на объекте исследования. Доказанное нарушение секреции бикарбоната в мочу при индуцированном алкалозе у нокаутных животных является важным физиологическим наблюдением и свидетельствует о наличии компенсаторного механизма регуляции в почках. Во всех экспериментах, описанных в данной работе использовали строго однопометных мышей (литтермейтсов), самок одного возраста (3-4 месяца). Схема получения мышей представлена на рисунке 6.

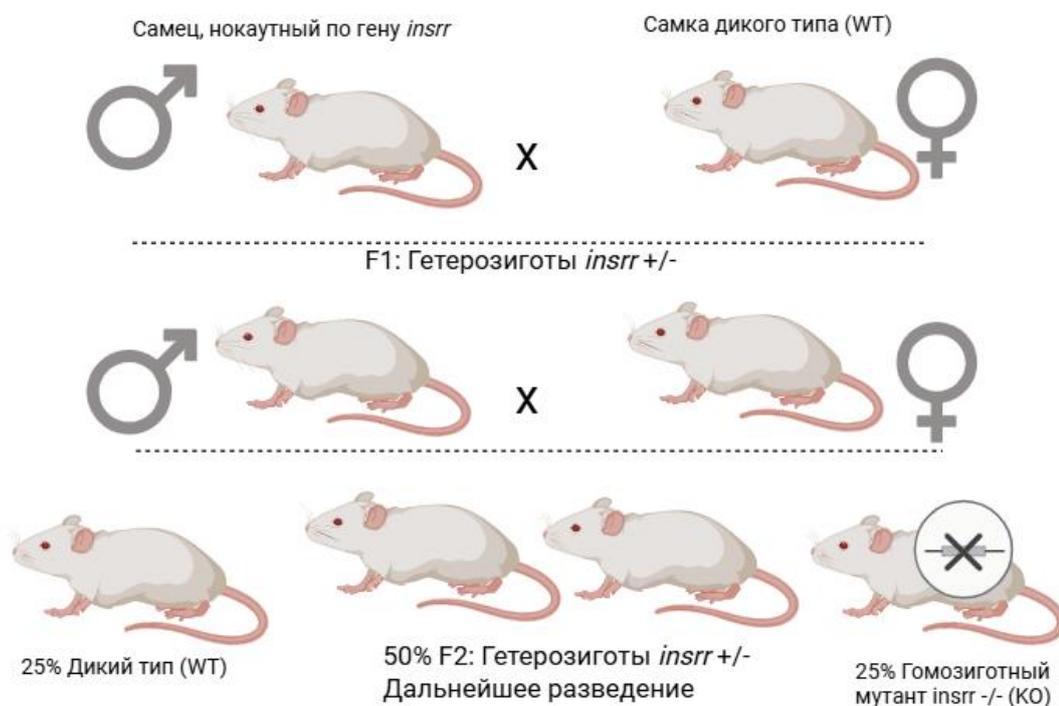


Рисунок 6 – Схема получения однопометных мышей, литтермейтсов.

Основная линия мышей содержится в питомнике филиала ИБХ в г. Пущино, Московская область. При получении потомства первого поколения гетерозигот, образцы ткани отправляли на генотипирование, которое проводили в нашей лаборатории. Проверку генотипа проводили методом ПЦР с геномной ДНК мышей, продукт детектировали с помощью электрофореза в агарозном геле. Для определения наличия нокаутной аллели использовали праймеры KO_irr1 и KO_irr2, для дикой аллели – mWT3 и mWT4. Всего в ходе работы был определен генотип более 200 мышей, примеры результатов генотипирования приведены на рис. 9. Определяли гетерозигот при наличии продукта ПЦР с обеих пар праймеров, тогда как в диком типе

или нокауте продукт ПЦР обнаруживается только при использовании одной из пар праймеров. Полученное расщепление проверяли методом статистической обработки данных χ^2 , чтобы подтвердить уровень значимости. Число степеней свободы было равно 2, предельное значение $\chi^2_{\text{теор}}=5,99$ при уровне значимости 0,05. На примере двух генотипирований в таблице 2 показано, что различия между теоритическими и ожидаемыми частотами не являются существенными. Классическое расщепление гетерозигот первого поколения 1:2:1 подтвердилось на линии мышей-литтермейтсов (см. риунок 7).

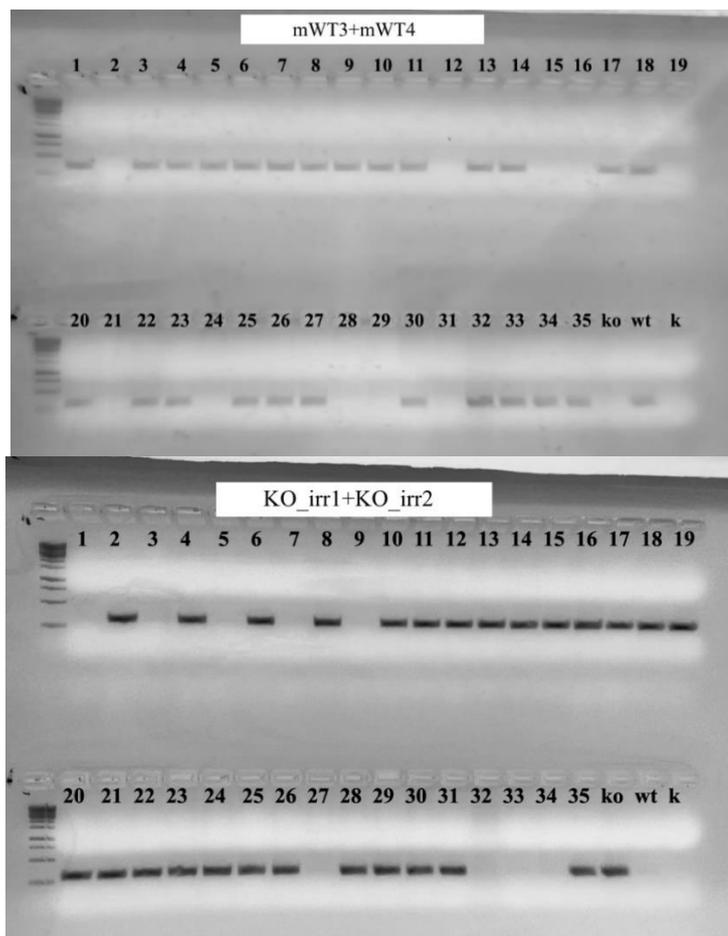


Рисунок 7 – Результаты генотипирования мышей от 07.2020 wt – положительный контроль на аллель дикого типа; ko – положительный контроль на нокаутный аллель; k – отрицательный контроль (вода)

Таблица 3. Определение генотипа мышей с учетом оценки соответствия между наблюдаемыми и ожидаемыми (теоретическими) распределениями расщепляющихся потомств по критерию χ^2

Дата	Генотип				Сумма
	Показатели	WT	КО	Гетерозиготы	
11.05.2020	Ожидаемое расщепление (H0)	1	1	2	4
	Наблюдаемые частоты (f)	17	17	25	59
	Ожидаемые частоты (F)	14,75	14,75	29,5	59
	Разность (f-F)	2,25	2,25	-4,5	
	Квадрат разности (f-F) ²	5,06	5,06	20,25	
	Отношение (f-F) ² /F	0,34	0,34	0,69	$\chi^2_{\text{факт}}=1,37$
	$\chi^2_{\text{теор}} = 5,99$				$\chi^2_{\text{факт}} < \chi^2_{\text{теор}}$
22.06.2020	Показатели	WT	КО	Гетерозиготы	Сумма
	Ожидаемое расщепление (H0)	1	1	2	4
	Наблюдаемые частоты (f)	9	10	16	35
	Ожидаемые частоты (F)	8,75	8,75	17,5	35
	Разность (f-F)	0,25	1,25	-1,5	
	Квадрат разности (f-F) ²	0,06	1,56	2,25	
	Отношение (f-F) ² /F	0,007	0,18	0,13	$\chi^2_{\text{факт}}=0,31$
	$\chi^2_{\text{теор}} = 5,99$				$\chi^2_{\text{факт}} < \chi^2_{\text{теор}}$

3.2. Морфологическое описание почек мышей двух генотипов

Отличия в микроскопической структуре коркового и мозгового вещества, а также частей нефронов, выявленные при морфометрической оценке поперечных срезов почек на уровне почечной лоханки, окрашенных гематоксилин-эозином. В результате анализа срезов с помощью микроскопии обнаружили, 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 строение типичной паренхимы почек. Таким образом, можно сделать вывод, что нокаут гена *insrr* не приводил к какому-либо патологическому нарушению строения почек. После получения изображений почечных тканей, проводили измерение площади каждого почечного тельца и толщины коркового и мозгового вещества с помощью специализированных инструментов анализа изображений.

При морфометрической оценке поперечных срезов почек на уровне почечной лоханки, окрашенных гематоксилин-эозином (рисунок 8), были обнаружены различия в толщине паренхимы, а также площади почечного тельца и диаметра собирательной трубки. При оценке толщины паренхимы почек, на горизонтальных срезах почек в программе Image Scope M откладывали отрезки соответствующие толщине паренхимы. После оценки численного отношения паренхимы почки к общему диаметру горизонтального среза обнаружили отличия у нокаутных животных. Достоверное изменение значений толщины паренхимы у нокаутных мышей в условиях экспериментального алкалоза при сравнении с мышами дикого типа. При этом в условиях моделирования алкалоза происходит увеличение толщины паренхимы как у нокаутных животных, так и у животных дикого типа. Такие же измерения провели для измерения площади почечных клубков. Общую площадь среза оценивали в программе Image Scope M и сравнивали с площадью почечных клубочков. При сравнении двух генотипов обнаружили значительное увеличение площади почечных клубков у животных дикого типа в нормальных условиях по сравнению с нокаутными мышами в условиях щелочного pH. Нокаут гена *insrr* не приводил к из-

менению площади почечного тельца, однако показано, что моделирования алкалоза приводила к значимому увеличению его площади. Дополнительно было проведено измерение ширины просвета собирательных трубок, для обоих условий – нормальные условия и экспериментальный алкалоз у животных обоих генотипов. Наблюдалось значительное увеличение ширины просвета собирательных трубок у животных дикого типа в нормальных условиях, нежели в случае с этим же генотипом при щелочной нагрузке. Однако, животные дикого типа демонстрируют больший просвет собирательных трубок, чем нокаутные по гену *insrr*. В целом, размер почек у нокаутных мышей оказался меньше, чем у мышей дикого типа. На рисунке 9 показаны численные отличия морфометрических показателей почек животных двух генотипов в разных условиях.

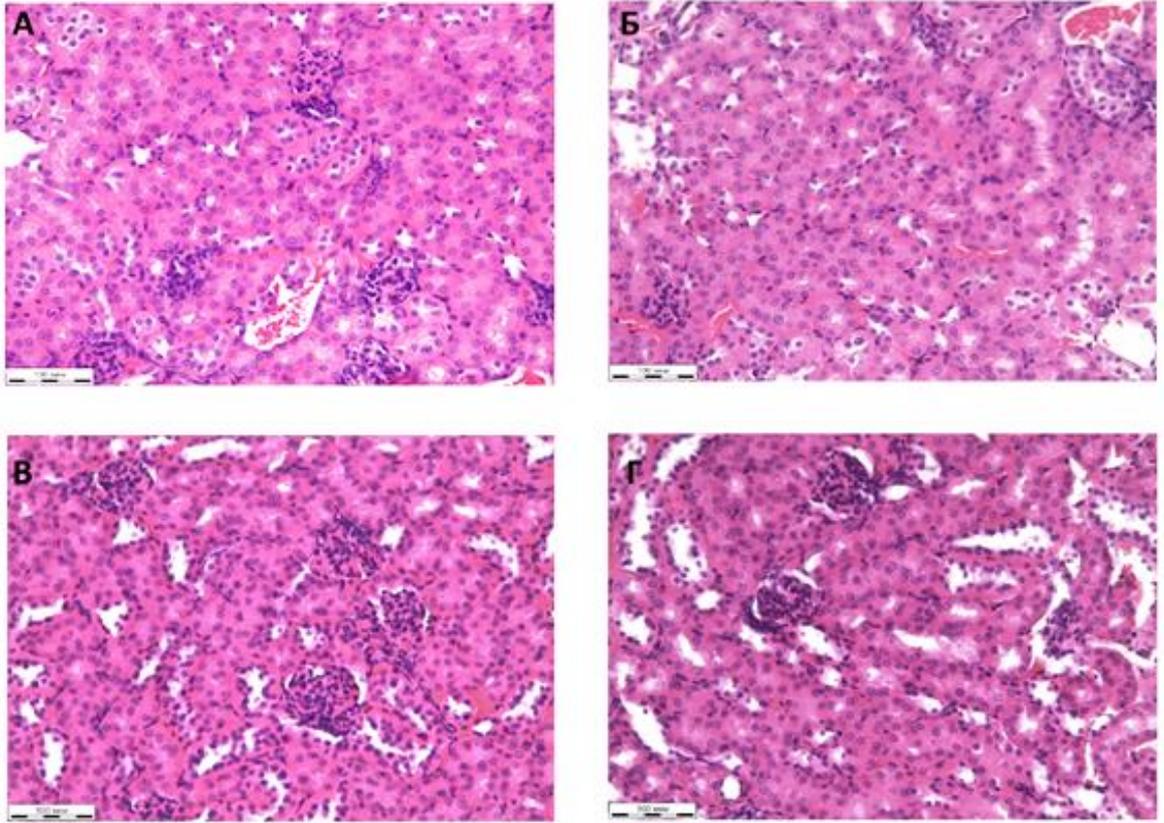


Рисунок 8 – Окрашивание почек гематоксилин-эозин, увеличение 20[×]. А – WT (IRR+/+) в нормальных условиях, Б – WT (IRR+/+) в условиях бикарбонатной нагрузки, В – КО (IRR -/-) в нормальных условиях, Г – КО (IRR -/-) в условиях бикарбонатной нагрузки. Масштабная линейка – 100 мкм. Количество животных n=4 в каждой группе.

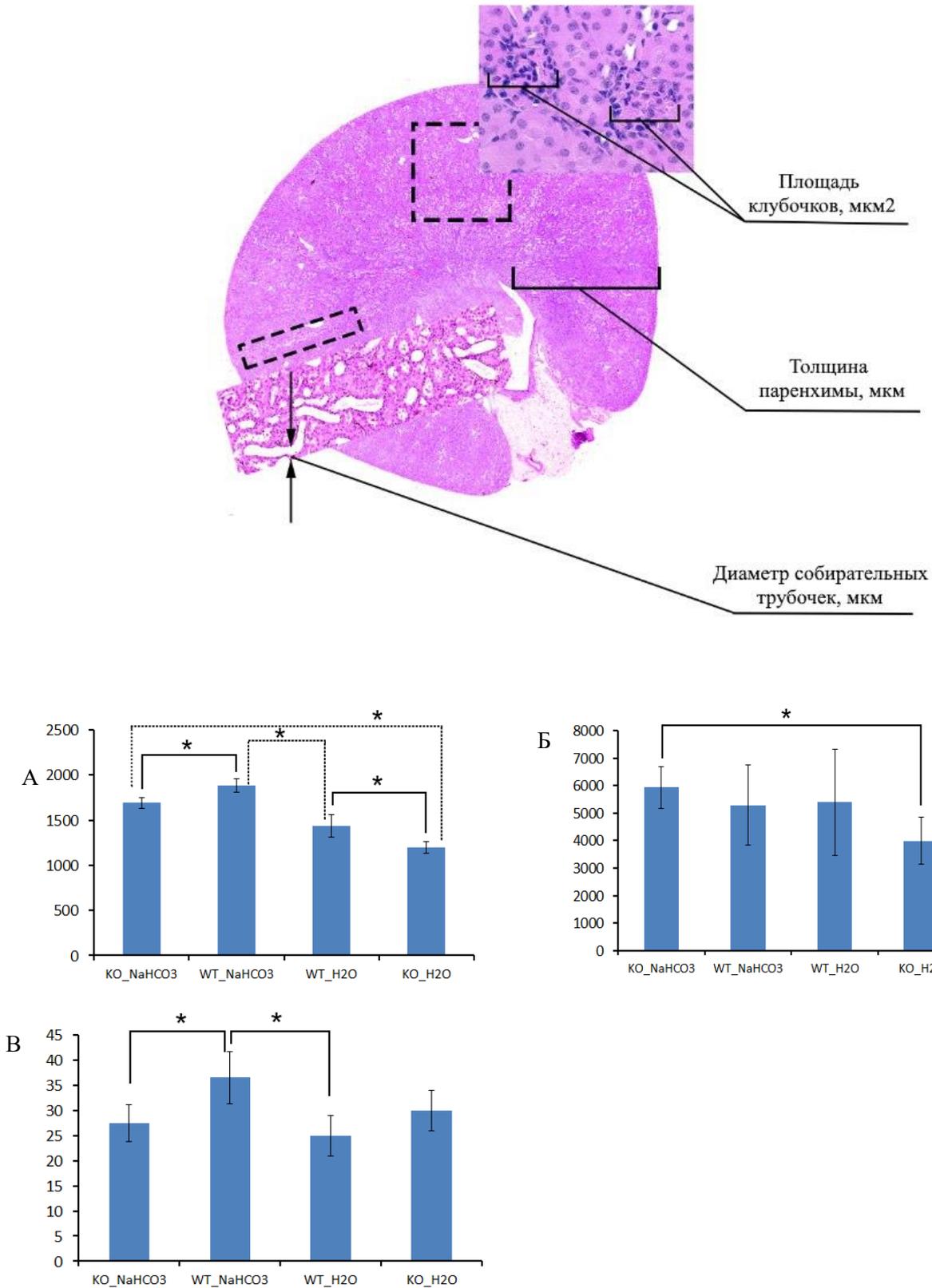


Рисунок 9 – Морфометрическая характеристика почек. Сверху представлены обозначения измеряемых параметров на поперечном срезе почки, окрашенной гематоксилин-эозином. Снизу гистограммы с численными значениями измеряемых параметров. А – толщина паренхимы, мкм, Б – площадь почечного тельца, мкм², В – диаметр собирательных трубочек, мкм. Дан-

ные представлены как среднее±стандартное отклонение, * - статистически значимые различия, $p < 0,05$. Сходные данные были получены и при изучении диаметра собирательных трубок. Увеличение рН питьевой воды приводило к увеличению диаметра собирательных трубок у животных дикого типа, при этом диаметр собирательной трубки почки животных дикого типа был значимо больше, чем диаметр собирательных трубок в почках нокаутных животных в условиях алкалоза. Количество животных $n=4$ в каждой группе.

3.3. Иммуногистохимическое окрашивание срезов почек мышей

Снижение экспрессии пендрина и нарушение секреции бикарбоната с мочой могут быть связаны с изменением количества или соотношения вставочных клеток у животных с нокаутом *insrr*. Произвели подсчет вставочных клеток в почках мышей дикого типа и мышей с нокаутом *insrr* в нормальных и щелочных условиях нагрузки. Было проведено тройное иммунофлуоресцентное окрашивание срезов почек на AE1, пендрин и E-субъединицу АТФазы V-типа (рисунок 10, А-Г). AE1 является маркером α -вставочных клеток, которые имеют АТФазу V-типа на апикальной мембране и анионообменник (AE1) на базолатеральной мембране. 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 не наблюдали каких-либо изменений числа вставочных клеток при щелочной нагрузке у мышей обоих генотипов (рисунок 10, Д-Е).

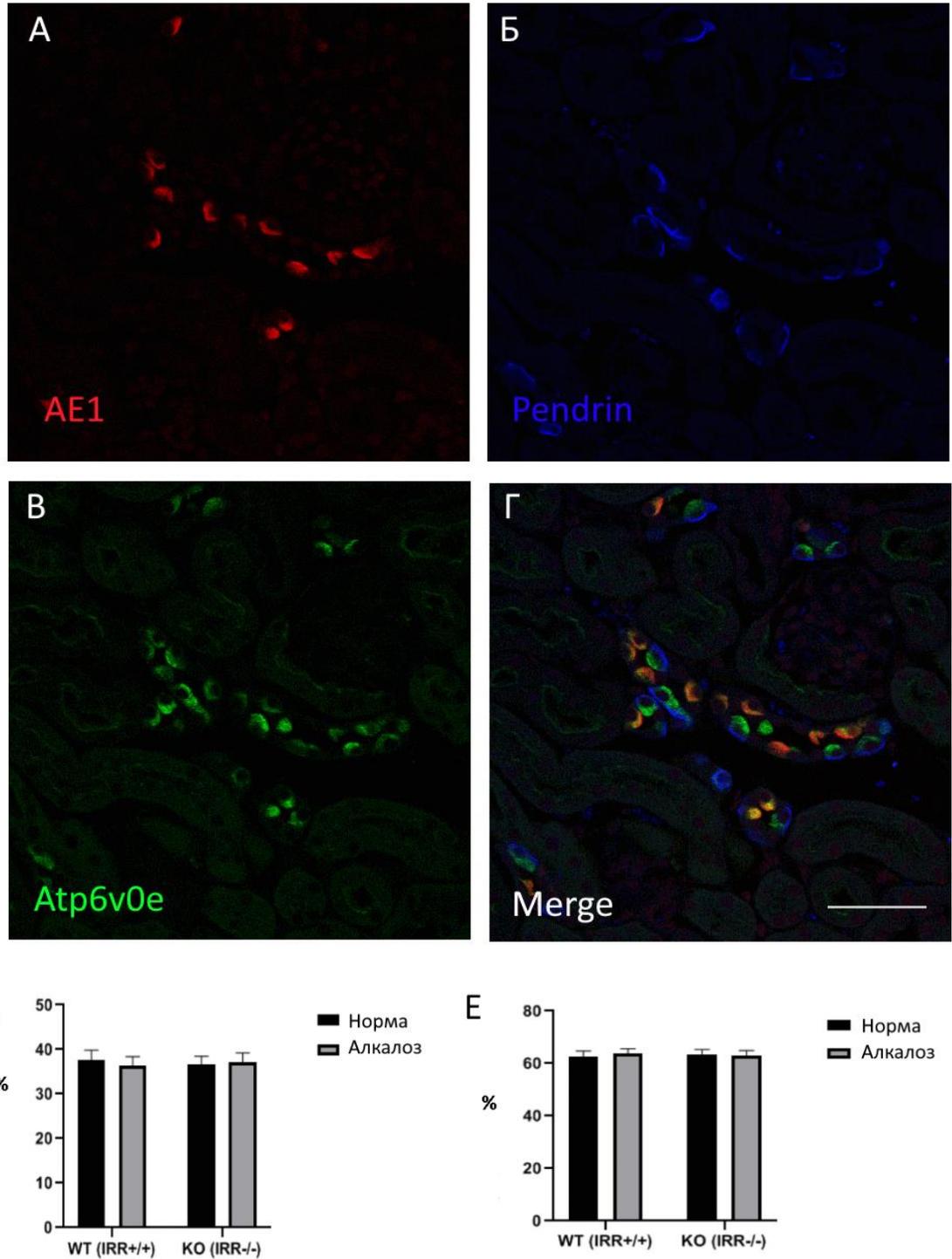


Рисунок 10 – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание срезов почек, анти-анионный обменник 1 AE1, конъюгированное с Cy5 (A), антипендрин, конъюгированное с Alexa Fluor 555 (Б), анти-Е-субъединица H⁺-АТФазы, конъюгированное с Alexa Fluor 488 (B), наложение (Г). Увеличение $\times 20$, масштабная линейка – 50 мкм Подсчет интеркарированных клеток AE-позитивных (Д), пендрин-позитивных (Е). Количество животных n=4 в каждой группе.

3.4. Популяция макрофагов почек

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 11).

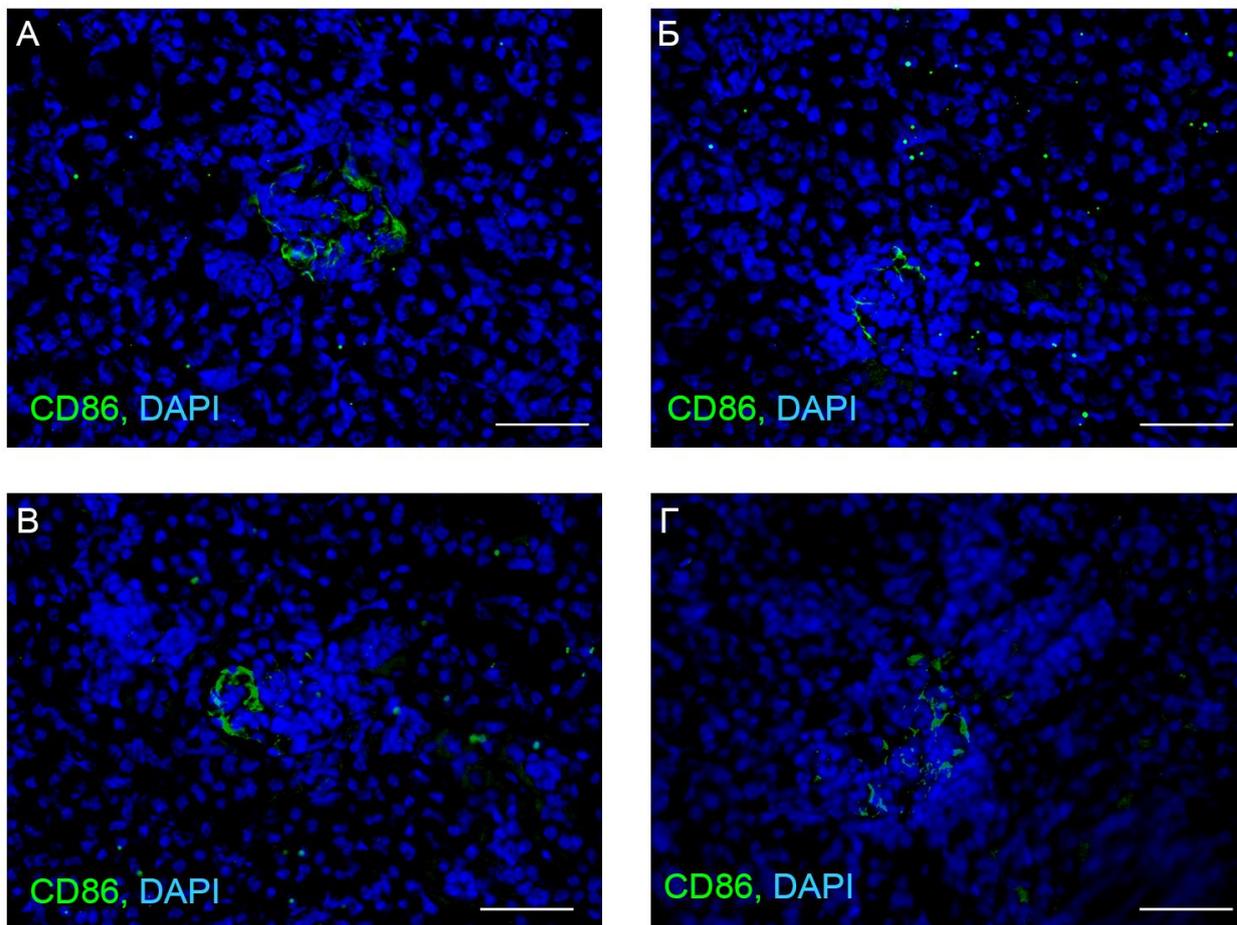


Рисунок 11 – Иммуногистохимическое исследование маркера макрофагов CD86. А – WT (IRR+/+) в нормальных условиях, Б – WT (IRR+/+) в условиях бикарбонатной нагрузки, В – КО (IRR -/-) в нормальных условиях, Г – КО (IRR -/-) в условиях бикарбонатной нагрузки. Зеленое свечение – FITC, ядра докрашены DAPI (синее свечение). Увеличение $\times 20$, масштабная линейка – 50 мкм. Количество животных $n=4$ в каждой группе.

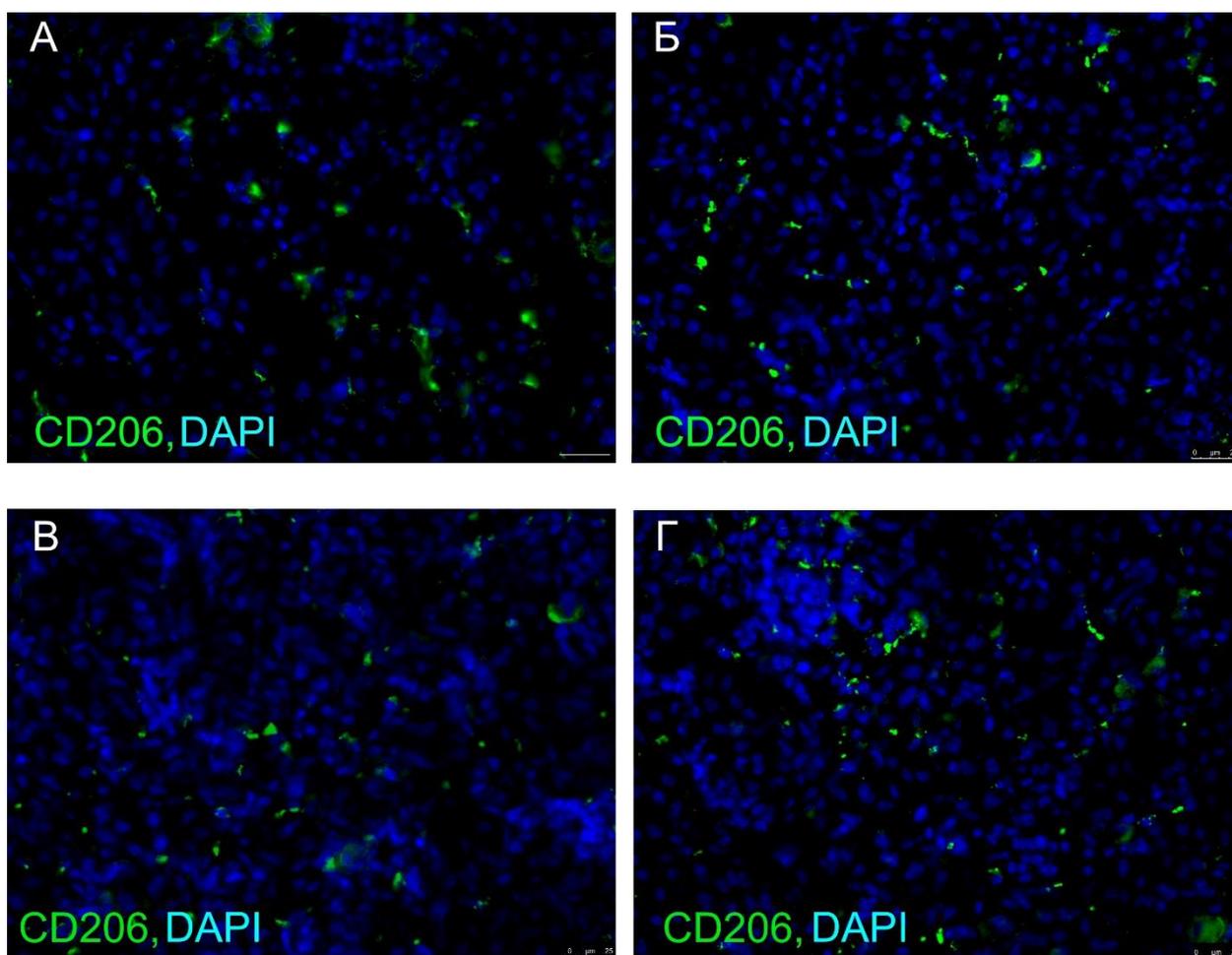


Рисунок 12 – Иммуногистохимическое исследование маркера макрофагов CD206. А – WT (IRR+/+) в нормальных условиях, Б – WT (IRR+/+) в условиях бикарбонатной нагрузки, В – КО (IRR -/-) в нормальных условиях, Г – КО (IRR -/-) в условиях бикарбонатной нагрузки. Зеленое свечение – FITC, ядра докрашены DAPI (синее свечение). Увеличение $\times 20$, масштабная линейка – 25 мкм. Количество животных $n=4$ в каждой группе.

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 (рисунок.12), 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 (рисунок.13).

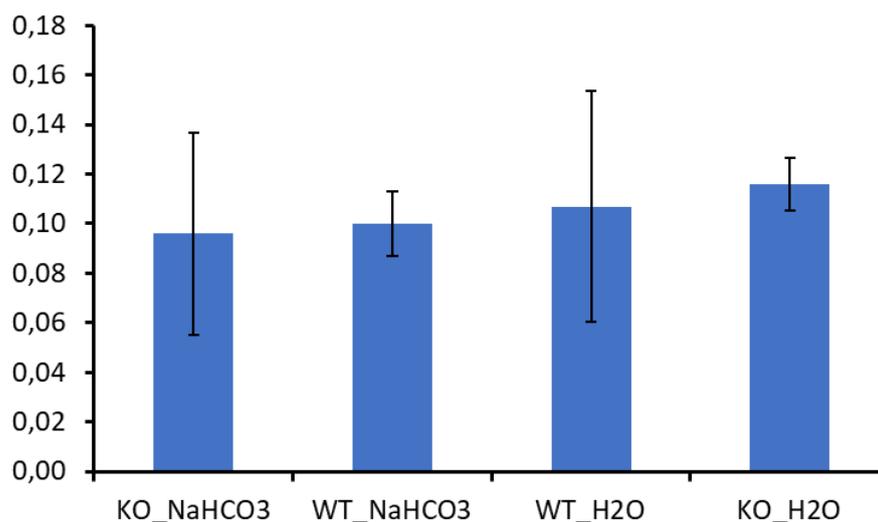


Рисунок 13 – Количество CD206 макрофагов в почке нокаутных животных и животных дикого типа по данным иммуногистохимического исследования, доля от общего количества клеток. WT (IRR+/+) – почки животных дикого типа, KO (IRR –/–) – почки нокаутных животных, представлены средние значения±стандартное отклонение.

3.5. Сравнительный анализ транскриптомов почек мышей

Был проведен сравнительный анализ транскриптомов почек мышей дикого типа и IRR-нокаутных в нормальных условиях и в условиях экспериментального алкалоза при помощи широкомасштабного секвенирования, получены четыре группы данных об уровне экспрессии белков (WT физиологические условия, WT при щелочной нагрузке, KO физиологические условия, KO при щелочной нагрузке). В каждой группе было 4 животных, всего 16 животных. Анализ полученных библиотек кДНК из почек с глубиной прочтения 20 млн ридов выявил достоверные отличия в экспрессии нескольких тысяч генов, как в условиях нормального содержания, так и при щелочной нагрузке.

В результате транскриптом содержал 13430 генов, из которых при нокауте гена *insrr* в нормальных условиях достоверно изменяют свою дифференциальную экспрессию 2316 генов, из них 1348 с увеличенной экспрессией, 968 с уменьшенной экспрессией. В условиях щелочной нагрузки достоверно изменили дифференциальную экспрессию 2879 генов, из них 1504 с увеличенной экспрессией в генотипе с нокаутом гена *insrr*, 1375 с пониженной экспрессией (рисунок. 14 А). Таблицы с изменениями экспрессии и аннотацией генов представлены в таблицах 4 и 5. Представление данного набора данных РНК-seq было визуализировано с использованием графиков анализа главных компонент (РСА). График РСА экспрессии генов представляет собой карту расстояний между образцами, из которых могут быть получены характеристики данных РНК-seq. Этот подход четко различает данные последовательности РНК в соответствии с уровнями экспрессии генов. На рисунке 14 Б видно, что экспериментальные группы достоверно

отличаются между собой, анализ основных компонентов образцов RNA-seq показывает, что нокаут IRR оказывает сильное влияние на экспрессию генов в почках мыши по первому основному компоненту (генотип). Образцы также группируются по воздействию (вода или бикарбонат) по одному и тому же компоненту. Более того, из рис. 14 В (F-статистика, F-критерий QL между нокаутными образцами и образцами дикого типа, умноженная LogFC; два разных условия) видно, что эффект нокаута IRR почти не зависит от бикарбонатной нагрузки. В то же время влияние бикарбонатной нагрузки на экспрессию генов, по-видимому, возможно между мышами с нокаутом и диким типом, хотя в целом этот эффект невелик.

Таблица 4. Топ-25 DEG, которые изменяют экспрессию в почках мышей после нокаута *insrr*.

gene	Log2FoldChange (KO_H2O/WT_H2O)	Log2FoldChange (KO_NaHCO3/WT_NaHCO3)
Mir6236	-2,058263123	-2,280591659
Rny3	2,25686535	1,909055933
Rps3a1	-3,02495289	-1,366796218
Rps7	-1,585694279	-1,773288062
Gapdh	-1,52576309	-1,702721473
Rpl35	1,784358459	1,429682524
Nme2	-1,579963859	-1,548887504
AC161763.1	1,496358239	1,614889571
mt-Nd6	1,471731788	1,641139945
Gm13341	1,646292464	1,463259657
Gm22009	1,639439892	1,412646109
n-R5-8s1	1,831231015	1,228719213
Atn1	1,520501347	1,370618284
Gm4076	1,363485504	1,419551667
S100a11	1,322800524	1,364729957
Pet100	1,35556447	1,308720198
mt-Nd4	1,331661344	1,325597518
Rpl38	-1,145617672	-1,499381338
Fgg	-1,430195634	-1,17688189
mt-Nd2	1,247125958	1,24262486
Rpl29	1,376983997	1,121918675
Atpif1	1,25140621	1,166675352
Tnfsf12	1,087786667	1,330118092
Scarna2	1,292893926	1,047653949
Dynl1b	-1,222251263	-1,105330061

Таблица 5. Топ-25 дифференциально экспрессирующихся генов, которые в зависимости от нокаута IRR изменяют экспрессию в почках мышей при бикарбонатной нагрузке.

gene	Log2FoldChange (WT_NaHCO3/WT_H2O)	Log2FoldChange (KO_NaHCO3/KO_H2O)
Cptp	0,631934	-0,16362
Nr4a1	0,558604	-0,19521
Lpar2	0,515627	-0,1642
Rcan1	0,503813	-0,1184
Arrdc2	0,489157	-0,08081
Kcnk5	0,417398	-0,08932
Slc52a3	0,277623	-0,34148
Gsr	0,273031	-0,2831
Slc22a12	0,199252	-0,29684
Cbr3	0,187706	-0,40673
Atp5k	0,18106	-0,2838
Atp6v1g3	0,17637	-0,37808
S100a10	0,172713	-0,36741
Pcx	0,134581	-0,3683
Gc	0,131663	-0,46807
Slc51b	0,0979	-0,48568
Svopl	0,096573	-0,45588
Cdc42ep3	-0,09602	0,330925
Nrp2	-0,10993	0,351585
Igfbp3	-0,1592	0,351059
Slc14a2	-0,17895	0,430528
Prelp	-0,18757	0,427061
Wfdc16	-0,25856	0,532557
Tnfsf10	-0,39561	0,15205
Dio1	-0,59044	0,072754

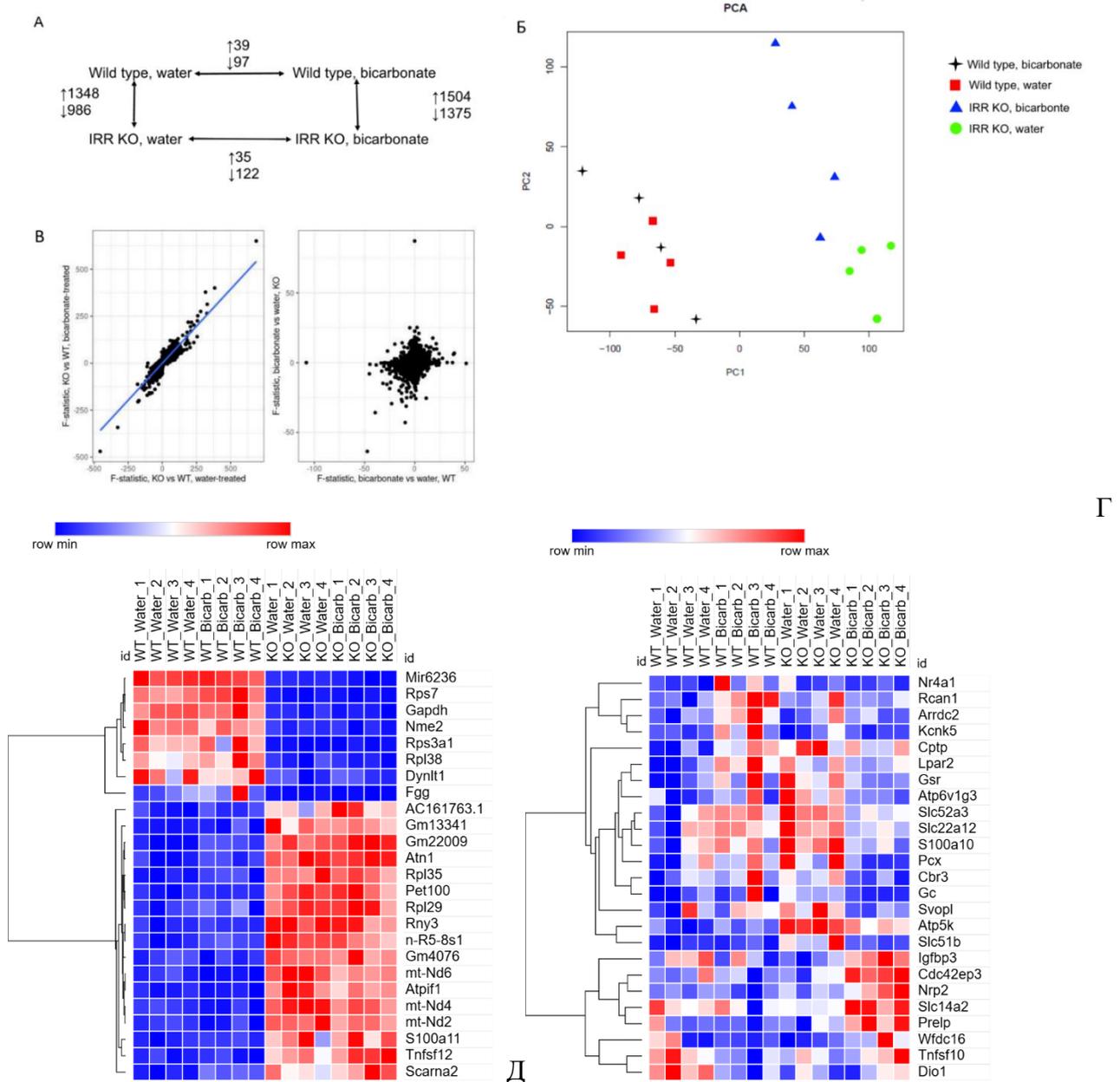
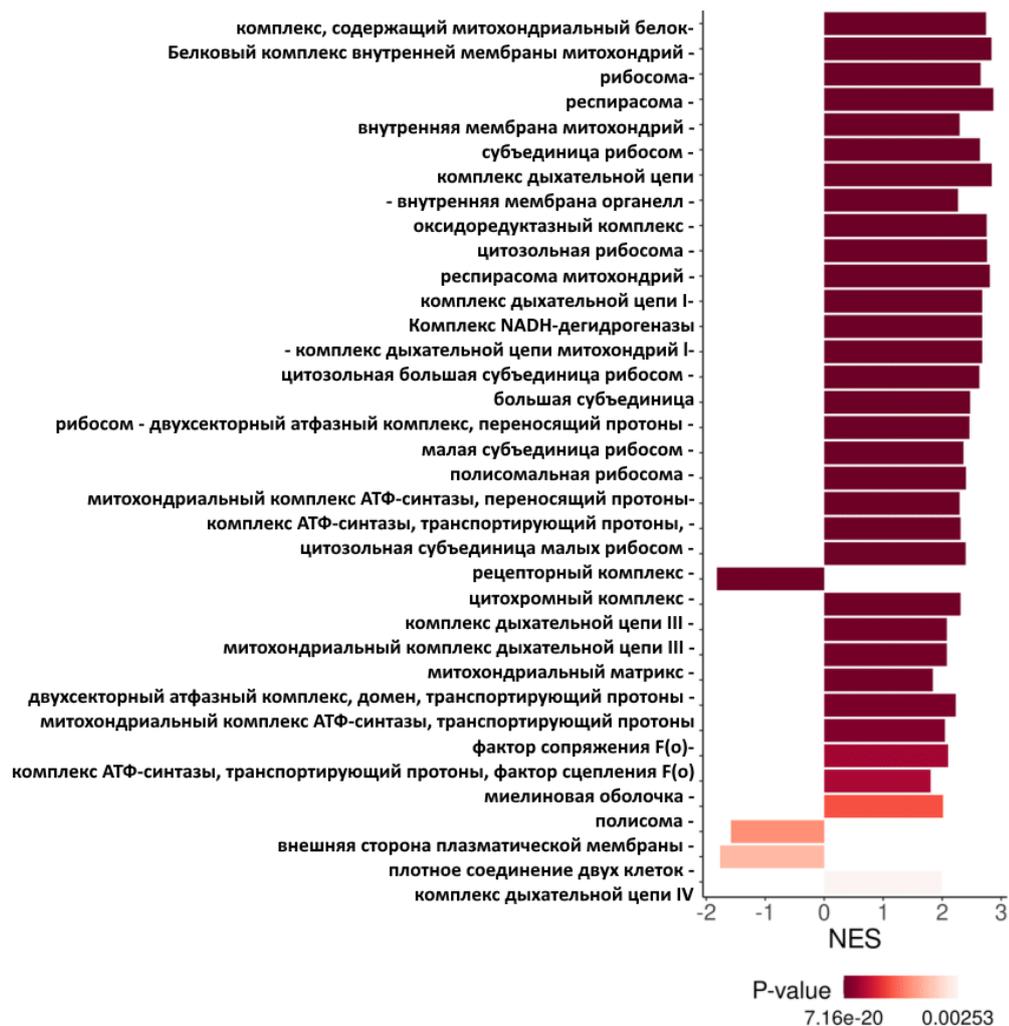


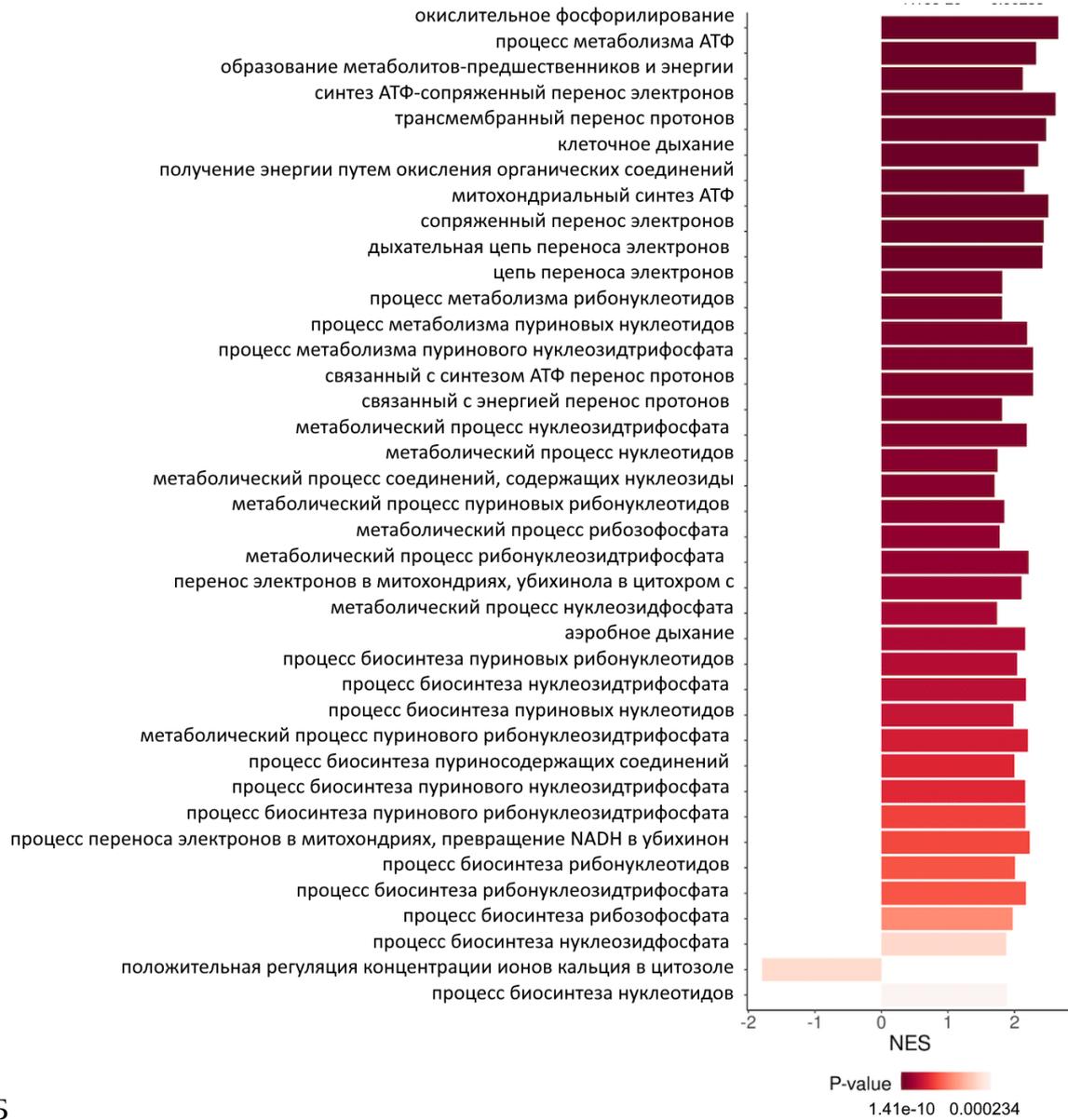
Рисунок 14 – А – количество генов с изменением дифференциальной экспрессии (DEG), Б – анализ PCA образцов на основе матрицы RPKM, В – слева F-статистика F-критерия QL между нокаутными и дикими образцами, умноженная на знак кратности изменения; мышей обрабатывают либо водой, либо бикарбонатом (коэффициент корреляции Пирсона = 0,88, $p < 0,001$). Справа: F-статистика, F-тест QL между образцами, с бикарбонатной нагрузкой и нормальными условиями; IRR либо был нокаутирован, либо нет; Г – heatmap топ-25 генов, экспрессирующихся при нокауте IRR; Д – heatmap топ-25 генов, экспрессирующихся в различных условиях.

Гены с достоверно изменяющейся экспрессией были аннотированы, проведен анализ Gene Ontology для выявления основных процессов, задействованных при изменении генотипа. Ресурс «Онтология генов» - это наиболее полная и широко используемая база знаний о функциях генов. В GO все функциональные знания структурированы и представлены в форме для по-

следующего биоинформатического анализа, который необходим для поддержки современных биологических исследований. База знаний GO структурирована с использованием формальной онтологии путем определения классов функций генов (терминов GO), которые имеют определенные отношения друг с другом. Терминам GO часто даются логические определения или аксиомы эквивалентности, которые определяют термин относительно других терминов в GO или других онтологиях, так что их отношения могут быть вычислены с использованием логических рассуждений. На рис.15 и 16 представлены наиболее изменяющиеся при нокауте биологические процессы. Анализируя эти рисунки, можно сказать, что основные изменения экспрессии наблюдаются для генов, участвующих в процессах метаболизма, в энергетических процессах клетки, таких как транспорт электронов и синтез АТФ. Отличия в таких фундаментальных процессах при нокауте IRR позволяют предположить, что внешнее сходство двух генотипов обманчиво, и на молекулярном уровне происходят значительные нарушения метаболизма, физиологические проявления которых пока не были описаны.



А



Б

В

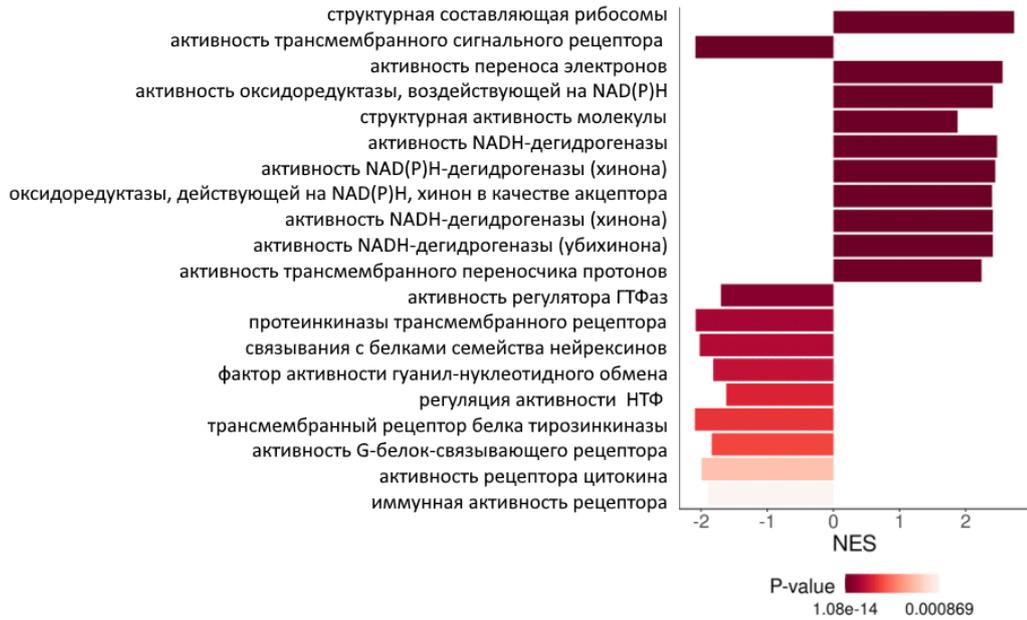
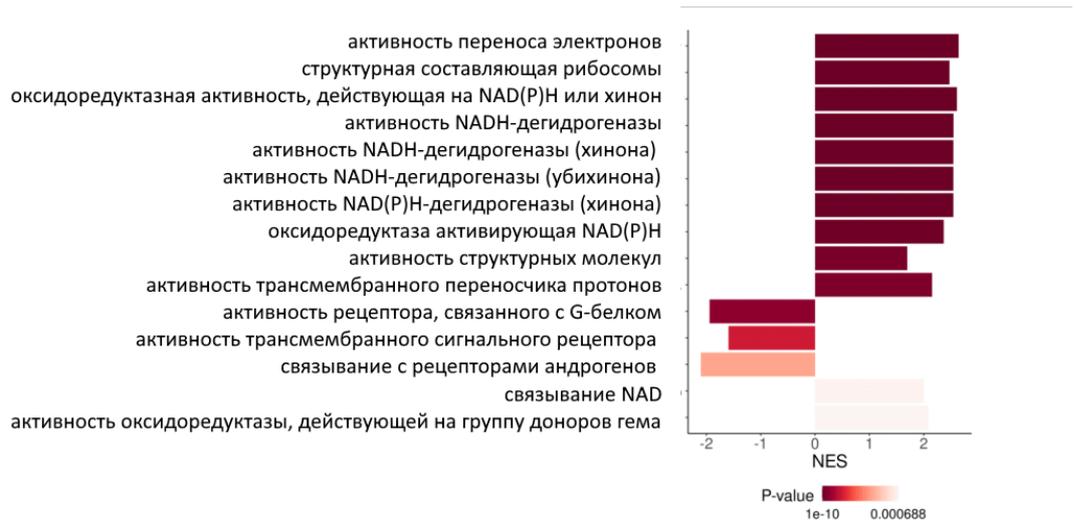


Рисунок 15 – Термины GO, при нокауте IRR в нормальных условиях (fgsea на logFC, скорректированное значение $p < 0,05$), NES - нормализованные показатели обогащения (положительные - повышенная регуляция при нокауте, отрицательная - пониженная регуляция) А - клеточные компоненты; Б - биологические процессы; В - молекулярные функции



A

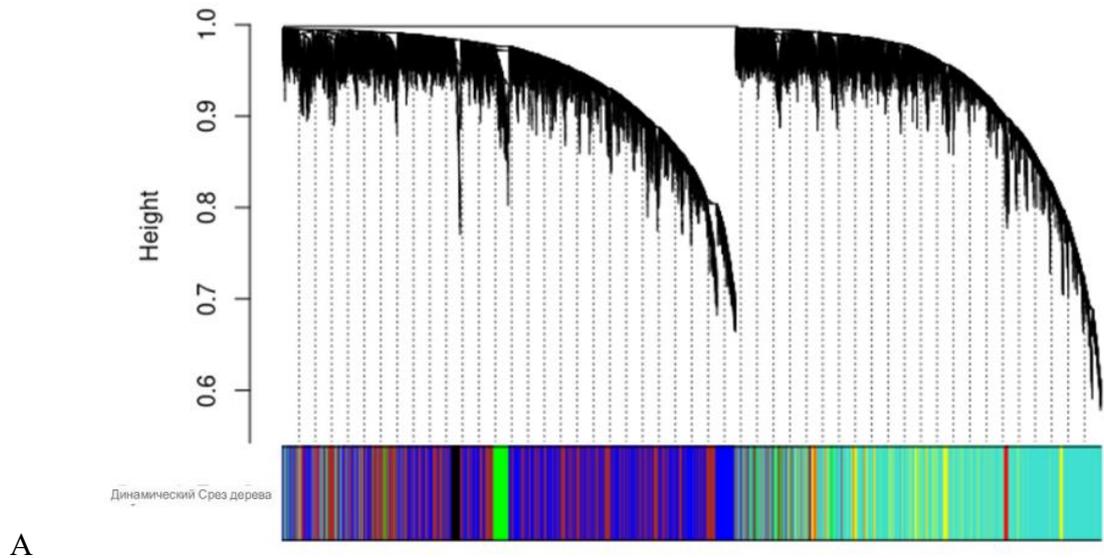


Б

Рисунок 16 – GO термины для генов DE между КО и WT (в условиях алкалоза) Термины GO, при нокауте IRR в нормальных условиях (fgsea на logFC, скорректированное значение $p < 0,05$), NES - нормализованные показатели обогащения (положительные - повышенная регуляция при нокауте, отрицательная - пониженная регуляция) А - клеточные компоненты; Б - молекулярные функции.

На рисунке 17 приведен анализ WGCNA, 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. 13 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 бикарбонатой нагрузки ($p = 0,03$ без коррекции). Из генов бирюзового, синего и коричневого модулей были выбраны DEG (QL F-тест FDR $< 5\%$, либо при обработке бикарбонатом, либо в нормальных условиях), которые наиболее коррелировали с собственными генами модуля (коэффициент корреляции Пирсона $> 0,8$). В

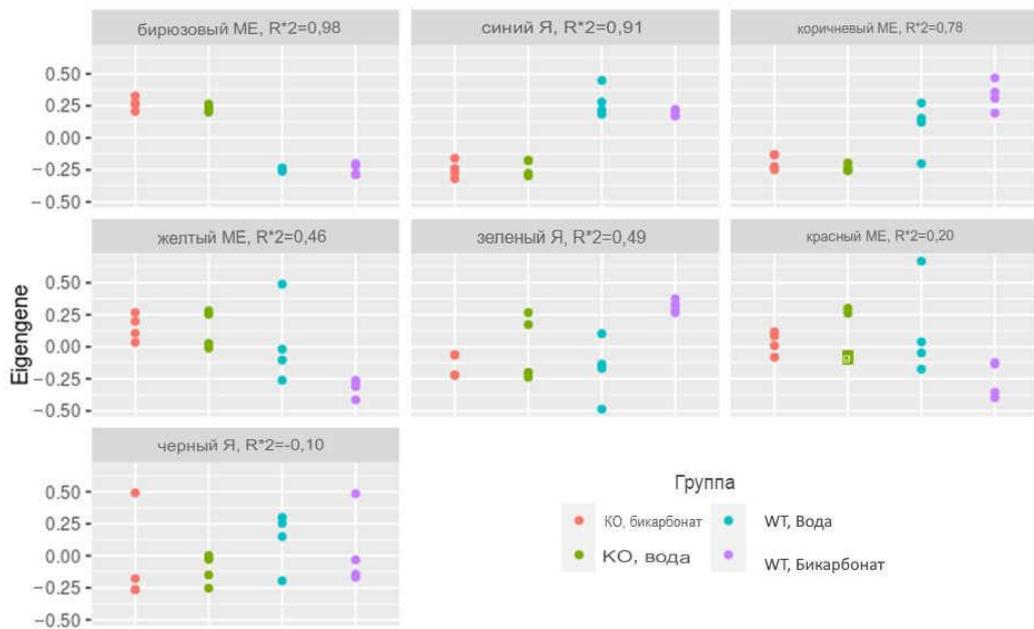
Выполнили GO-анализ сверхпредставленности генов в полученных списках. Бирюзовый модуль, который соответствует генам, активированным у мышей с нокаутом, тесно связан с окислительным фосфорилированием. Напротив, синий модуль, гены которого активируются у дикого типа, связаны со многими другими биологическими 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 17 – 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).

При поиске потенциально рН-чувствительных белков в данных нашего РНК-секвенирования, был введен показатель $Ratio = \frac{WT_{bicarb}/WT_{water}}{KO_{bicarb}/KO_{water}}$, так же было рассчитан модуль изменения $= \frac{P}{1/P}$. Составив список генов, рассматривали гены, которые могли быть как-то свя-

заны с рецепторной тирозинкиназой IRR. Были выявлены гены, сопряженные с экспрессией щелочного сенсора IRR и регулируемые экспериментальным алкалозом, которые были объединены в несколько групп: рибосомальные гены (*rpl35*, *rpl29*, *rpl23*); митохондриальные гены (*mt-Nd1*, *mt-Cytb*, *mt-Nd6*, *chchd10*, *apoo*); остальные гены (*atn1*, *zfp3611*, *tnfsf12*, *fxyd1*, *clcc2d*). Различающиеся при алкалозе гены – *igf2*, *ccl27a*, *irs2*, *cys1*, в нейтральной среде – *fabp1*, *csf2ra*, *creb3l3*, *clic6*. Были выделены гены, связанные с pH-чувствительностью, такие гены, экспрессия у которых изменяется в диком типе при добавлении бикаборната, а в нокауте остается на одном уровне – *slc51b*, *slc26a4*, *kcnk5*. Все эти гены были аннотированы с использованием современных баз данных: Mouse Genome Informatics, Uniprot, Genecode и др.

3.6. Исследование экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени

Для подтверждения полученных результатов секвенирования был выбран метод ПЦР в реальном времени. Перед проведением эксперимента были получены образцы кДНК из почек мышей. В экспериментах использовали также четыре группы животных WT физиологические условия, WT при щелочной нагрузке, КО физиологические условия, КО при щелочной нагрузке, в каждой группе было 4 животных. Полученную кДНК использовали как матрицу для ПЦР в реальном времени. Для каждого образца реакцию проводили в трех повторах, в качестве отрицательного контроля вместо кДНК использовали деионизованную воду mQ. Гены, которые были выбраны для проверки методом ПЦР, описаны в таблице 6, с краткими аннотациями и указанием фенотипа, возникающего при мутации или нокауте (при наличии). Как видно в таблице, классический ген *gapdh*, а также еще один распространенный ген «домашнего хозяйства» *rps7* не использовались в качестве референсных генов, так как по данным NGS сильно изменяют свою экспрессию при изменении генотипа. При поиске референсных генов, с помощью литературных данных [89], были подобраны два гена, экспрессия которых по данным NGS не изменялась у животных разного генотипа при различных условиях – *Ap3d1* и *Csnk2a2*. В ходе экспериментов ген *Ap3d1* показал более высокий уровень экспрессии и был выбран основным референсным геном для подсчета данных ПЦР в реальном времени.

Таблица 6. Гены, выбранные для проверки методом ПЦР в реальном времени

Ген	Название	Аннотация	Фенотип мутации
<i>slc26a4</i>	solute carrier family 26, member 4, pendrin	Активность трансмембранного переносчика анионов: хлорид, йодид, оксалат, бикарбонат; регуляция pH	Аномальная морфология внутреннего уха, аномальная физиология вестибулярной системы, снижение pH мочи
<i>rps7</i>	ribosomal protein S7	Рибонуклеопротеидный комплекс, связывание поли (U) РНК, отрицательная регуляция убиквитин-зависимого белкового катаболического процесса	Аномальная морфология коры головного мозга, аномальная морфология позвоночного поперечного отростка
<i>slc5a2</i>	solute carrier family 5, member 2	Активность трансмембранного переносчика D-глюкозы, почечная экскреция калия	Аномальная реабсорбция почечной глюкозы, повышение уровня калия в моче, снижение уровня циркулирующего инсулина
<i>aqp6</i>	aquaporin 6	Активность водных каналов, интегральный компонент плазматической мембраны, трансмембранный транспортер нитратов	Аномальная морфология почек, увеличение общей толщины сетчатки
<i>plcd1</i>	phospholipase C, delta 1	Метаболический процесс фосфатидилинозитола, сигнальный путь рецептора, связанный с G-белком, регулирование концентрации ионов кальция в цитозоле	Уменьшение количества В-лимфоцитов, увеличение секреции интерлейкина-17, уменьшение количества клеток эритроцитов
<i>gapdh</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Активность оксидоредуктазы, НАД или НАДФ в качестве акцептора, метаболиче-	Пониженное содержание гемоглобина, эмбриональная леталь-

		ский процесс глюкозы, клеточный ответ на интерферон-гамма, положительная регуляция продукции цитокинов	ность между имплантацией и образованием сомитов
<i>rny3</i>	RNA, Y3 small cytoplasmic (associated with Ro protein)	Инцирирование репликации ДНК, репликация ядерной ДНК	Нет сведений
<i>lypd2</i>	Ly6/Plaur domain containing 2	Закрепленный компонент мембраны, поверхностные маркеры для идентификации субпопуляции лейкоцитов	Нет сведений
<i>kcnk5</i>	potassium channel, subfamily K, member 5	Трансмембранный транспорт ионов калия, регуляция мембранного потенциала покоя, стабилизация мембранного потенциала, активность потенциалзависимых калиевых каналов	Снижение массы тела, аномальное дыхание, аномальная физиология нервной системы, аномальная скорость почечной фильтрации, повышенный уровень натрия в моче, пренатальная летальность
<i>slc6a6</i>	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	Активность симпортера таурин/Na, активность трансмембранного переносчика гамма-аминомасляной кислоты, модуляция синаптической передачи	Снижение гематокрита, дегенерация сетчатки, аномальная физиология сердечно-сосудистой системы, снижение женской фертильности, аномальная морфология мышечных волокон, снижение уровня циркулирующей глюкозы натоцак

<i>atp6v1g3</i>	ATPase H ⁺ transporting V1 subunit G3	Компонент вакуолярной АТФазы (V-АТФазы), мультисубъединичного фермента, участвует в сортировке белков, активации зимогена, опосредованный рецепторами эндоцитоза и генерации протонного градиента синаптических везикул.	Нет сведений
<i>ap3d1</i> (ген сравнения)	adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit	Транспорт рецепторов нейротрансмиттеров, позитивная регуляция дифференцировки НК-Т-клеток, организация мембран синаптических везикул, опосредованный везикулами транспорт, транспорт из Гольджи в вакуоли	Бледный цвет шерсти, тремор, уменьшенный размер тела, гиперактивность, аномальная физиология слуха, аномальная морфология проксимальных изви- тых канальцев, снижение пигментации глаз, снижение агрегации тромбоцитов

К выбранным целевым генам со статистически достоверной разницей были подобраны праймеры и специфически отжигающиеся зонды TaqMan, последовательности указаны в табл. 7. Для этого использовали программы GeneRuler, Oligo Analyzer, сайт NCBI Nucleotide.

Таблица 7. Список праймеров и зондов для генов, анализируемых с помощью ПЦР в реальном времени.

Ген	Прямой праймер от 5' к 3'	ТақМан зонд от от 5' к 3'	Обратный праймер от 5' к 3'	Размер продукта
<i>Rny3</i>	GGTTGGTCCG AGAGTAGTG	CAGTTACAGATTTCTTTGT TCCTTCTCCG	AAAGGCTGGTCA AGTGAAG	101 bp
<i>Rps7</i>	CCAGAAGCC GTACCCTG	CGCCATCCTTGAGGACTT AGTCTTCC	CTGCCATCCAGT TTCACAC	102 bp
<i>Gapdh</i>	TTGTCAGCAA TGCATCCT	TGGCCAAGGTCATCCATG ACA	CTGTGGTCATGA GCCCT	115 bp
<i>Slc5a2</i>	AGCGATCAG GTAATAGTG CA	CTCACATCAAAGCTGGGT GCATC	TCATGCCTGGCA TGAC	124 bp
<i>Slc6a6</i>	TCACATCCTT GGTTGATCTT	TATCGTCGGGAAATCTTC ATAGCCATC	CACCCTCCGTCA CCAT	119 bp
<i>Lypd2</i>	ACTGTGTCAC CACCACCC	ATGTGCAAGACTACGCTC TACTCCCTG	CGCAGGACTTGG TCACC	113 bp
<i>Aqp6</i>	CCATTGGATC TTCTGGGTA	TGTCCTGGCTTCGCTGATC TACAAC	TACCACTTTCTCC ACCTTTGT	123 bp
<i>Plcd1</i>	GCTGCAAGA ATCAGGAAA TA	CCATCTGAGCAGGATCTA CCCAGCT	AATCTGGCAGCC TCCATT	142 bp
<i>Kcnk5</i>	ACCACCATC GGTTATGG	TCTGTGTCTTCTACGGCCT CTTCG	AGGGCACTGATC CATGTC	100 bp

<i>Slc26a4</i>	ATGTCCCAA AGGTGCCAA T	TTGCGAATGATTGTCAAA GAATTTTCAGAGA	ACACATCATCTT GAAGCAGAGC	152 bp
<i>Atp6v1g</i> 3	CAGGGGATC CAACAGCT	AGAAAAGGAAAGCGACT GAGGCAA	CTGTA CTGGTCC GTCTCCG	125 bp
<i>Ap3d1</i>	TCAGTGCCTC TGAAAGTTCC	CTGGAGGAGCAGCGGCG ACA	AGAGAGCTGTGG CGCC	139 bp

Гены, изменяющие свою экспрессию, по данным ПЦР в реальном времени разделили на три группы: гены, чувствительные к изменению pH, гены с пониженной экспрессией и гены с повышенной экспрессией. Ниже представлены результаты для выбранных выше генов.

1. *kcnk5, potassium channel, subfamily K, member 5*

Калиевый канал TASK2, чувствительный к изменению pH внеклеточной среды, стабильно экспрессируется в проксимальных канальцах почек и собирательных трубках. Данные, полученные в результате РНК-секвенирования показывают повышение экспрессии TASK2 в диком типе при щелочной нагрузке, однако эти данные не подтверждаются в ПЦР в реальном времени, где показано наоборот повышение экспрессии калиевого канала в нокауте. Для РНК-секвенирования брали срез почки из срединной области, а для ПЦР брали почку целиком, соответственно, в образцах было разное количество клеток проксимальных канальцев, где экспрессируется TASK2. Если это верно, то в качестве более точных данных нужно брать данные ПЦР в реальном времени, что позволяет предположить существование некоего компенсаторного механизма в нефроне при алкалозе.

2. *atp6v1g3, mouse ATPase, H⁺ transporting, lysosomal V1 subunit G3*

Для гена *atp6v1g3* наблюдали подобную картину – различий при бикарбонатной нагрузке не было, а в нормальных условиях ген был повышен в нокаутном фенотипе. Это могло быть связано с тем, что мы наблюдали ранее при анализе генов РНК-секвенирования, основные процессы, активно изменяющиеся при нокауте были связаны именно с энергетическим обменом. У мышей с нокаутом гена *atp6v1g3* предполагается фенотип дистального почечного канальцевого ацидоза.

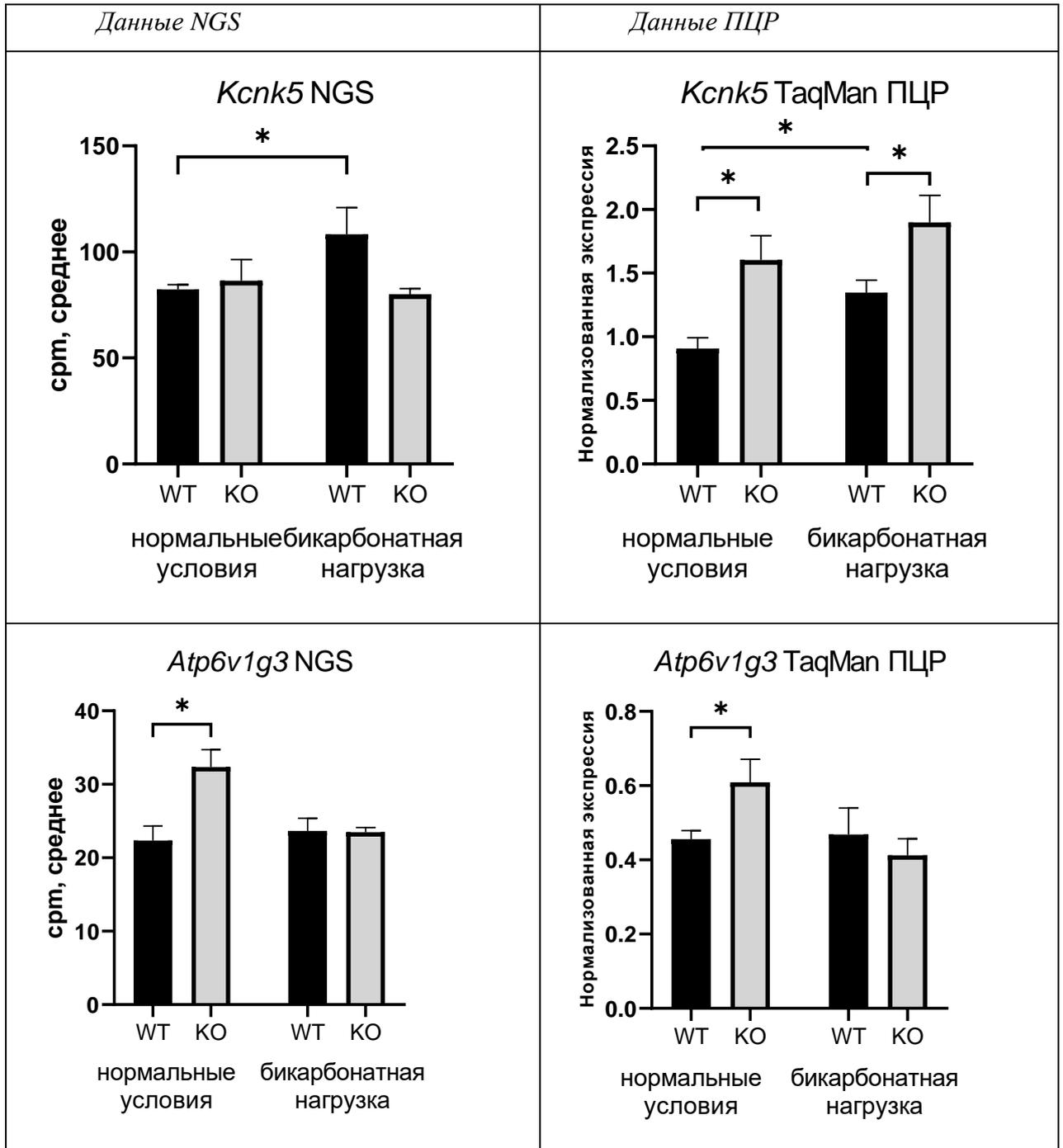


Рисунок 18 – Изменение экспрессии генов *kcnk5* и *atp6v1g3* при нокауте гена *insrr* и в условиях алкалоза, * $p < 0,05$

3. *slc26a4*, *solute carrier family 26, member 4*, *pendrin*

Пендрин, ионнообменный канал, ответственен за перенос ионов $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (не зависит от иона Na^+). Локализуется в β -вставочных клетках корковых собирательных трубочках, как и рецепторная тирозинкиназа IRR. Количество пендрина на белковом уровне уменьшается при нокауте рецепторной тирозинкиназы IRR. Эти данные были подтверждены методом NGS и ПЦР, см. рис. 19. Снижение уровня экспрессии пендрина свидетельствует о худшем выведении

бикарбоната в моче, что указывает на то, что нокаут IRR ухудшает способность собирательного канала адаптироваться к алкалозу.

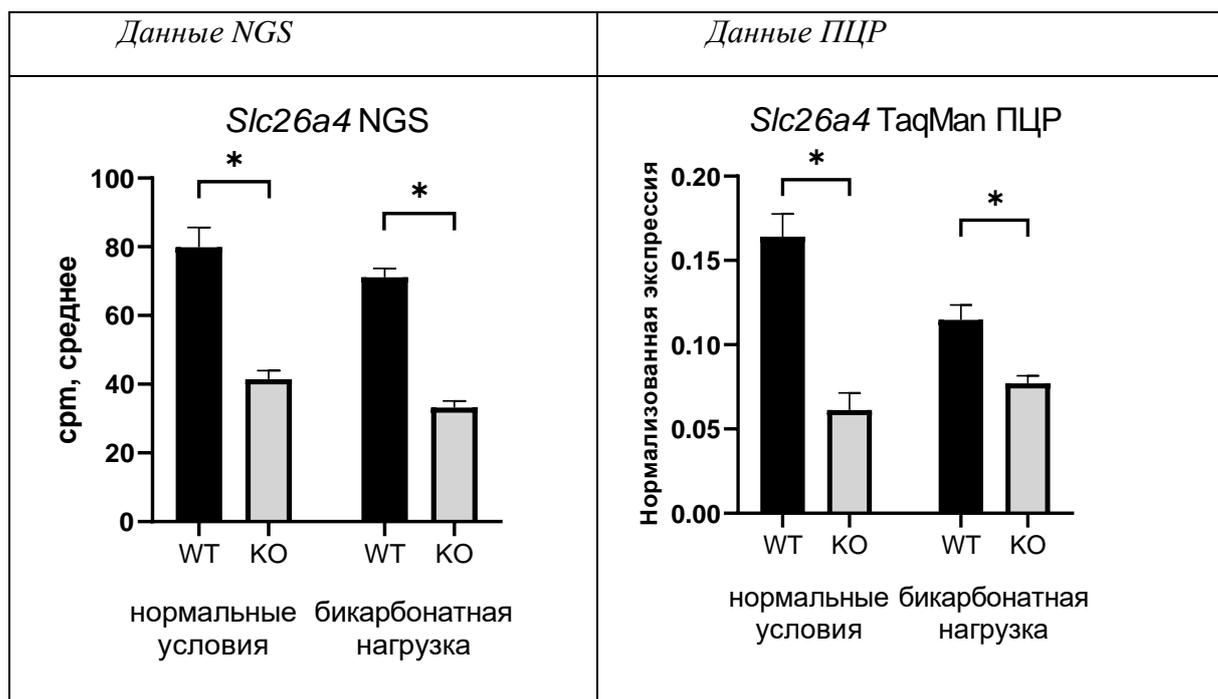


Рисунок 19 – Изменение экспрессии гена *slc26a4* при нокауте гена *insrr* и в условиях алкалоза, * $p < 0,05$

4. *rps*, ribosomal protein S7

Рибосомальный белок S7 является одним из рибосомальных белков, широко представленный в разных тканях и органах. Так как рибосома является основным клеточным компонентом синтеза белка, рибосомальные белки часто используются в качестве генов «домашнего хозяйства». Проявляя стабильную экспрессию, ген рибосомального белка может выступать в качестве нормирующего гена при проведении ПЦР в реальном времени, однако на рис. 20 показано, что его экспрессия значительно меняется при нокауте гена *insrr*. Следовательно, можно предположить, что основные процессы синтеза белка значительно изменены у животных дикого типа и нокаутных, в связи с этим, использовать этот ген в качестве референсного не рекомендуется.

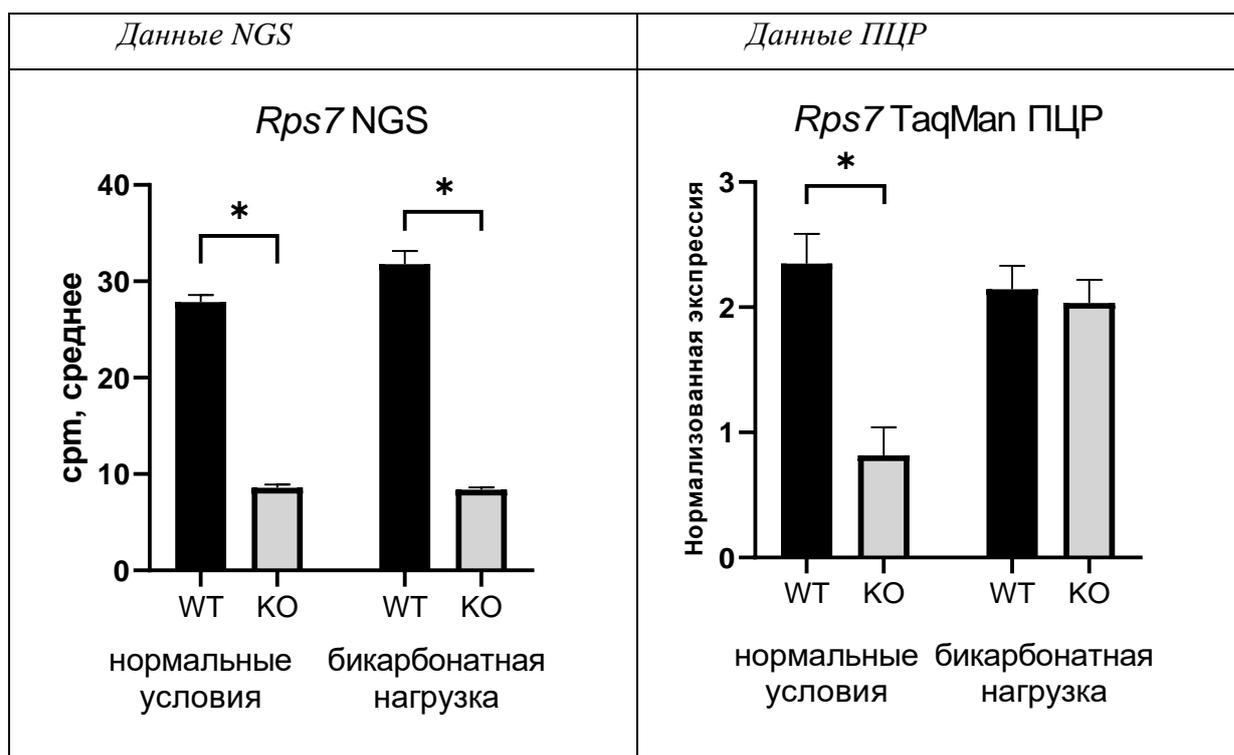


Рисунок 20 – Изменение экспрессии гена *rps7* при при нокауте гена *insrr* и в условиях алкалоза, * $p < 0,05$

5. *plcd1*, phospholipase C, delta 1

PLC фосфолипаза C – это цитоплазматический белок, который контролирует уровни фосфатидилинозитолфосфата PIP2 в клетках, локализуясь внутри или вне липидных рафтов в плазматической мембране и катализируя гидролиз фосфорилированных форм фосфатидилинозитола в ответ на клеточные стимулы. Расщепление PIP2 приводит к образованию двух продуктов. Один продукт, диацилглицерин (DAG), активирует кальций-зависимую протеинкиназу C (PKC), которая затем фосфорилирует нижестоящие эффекторы, такие как АКТ, для активации ряда клеточных функций, включая регулирование пролиферации клеток, полярности клеток, обучения, памяти и пространственного распределения сигналов [160].

Есть три идентифицированные изоформы PLC δ со сходными аминокислотными последовательностями, которые высоко эволюционно консервативны от низших эукариот к высшим. Члены семейства PLC δ активируются уровнями кальция, которые обычно обнаруживаются в цитоплазме (от 10^{-7} М до 10^{-5} М), что делает их одними из наиболее чувствительных к кальцию изоформ фосфолипаз C. PLC δ 1 локализуется в цитоплазме клеток, также эта изоформа перемещается между ядром и цитоплазмой активных клеток. Истощение PLC δ 1 приводит к блокировке клеточного цикла. Считается, что члены семейства PLC δ играют роль в усилении передачи сигналов кальция, участвуют в регуляции активации актинового цитоскелета. Исследования с использованием мышей с нокаутом PLC δ показали, что PLC δ 1 необходим для поддержания гомеостаза кожи; недавнее исследование показало, что PLC δ 1 необходим для целостности эпи-

дермального барьера. Нокаут PLC δ 1 приводил к эмбриональной летальности [173]. В почке именно эта изоформа фосфолипазы C представлена во многих типах клеток, наибольшее количество ее было обнаружено в медуллярной части TAL (толстого восходящего протока петли Генле). Так же представлена в гломерулярной части и собирательных трубках [106].

Результаты, полученные в результате эксперимента с почками мышей, представлены на рис. 21. По данным NGS уровень экспрессии гена *plcd1* снижен в нокауте в обоих условиях. По данным результатов ПЦР в реальном времени наблюдается пониженная экспрессия гена *plcd1* у нокаутных животных при нормальных условиях. У животных дикого типа в условиях экспериментального алкалоза также понижается экспрессия этого гена по сравнению с животными дикого типа при нормальных условиях. Ранее нами была установлена роль фосфолипазы γ 2 во внутриклеточном сигнальном каскаде (данные не опубликованы) при активации рецепторов семейства рецептора инсулина. Активация IRR в клетках HEK293T внеклеточной средой с pH 8,8 сопровождалась фосфорилированием фосфолипазы γ 2. Можно предположить, что фосфолипаза δ 1 тоже задействована в передаче сигнала от рецептора IRR. Эта связь прослеживается в участниках передачи сигнала АКТ и ERK 1/2, которые связаны и с фосфолипазами, и с IRR.

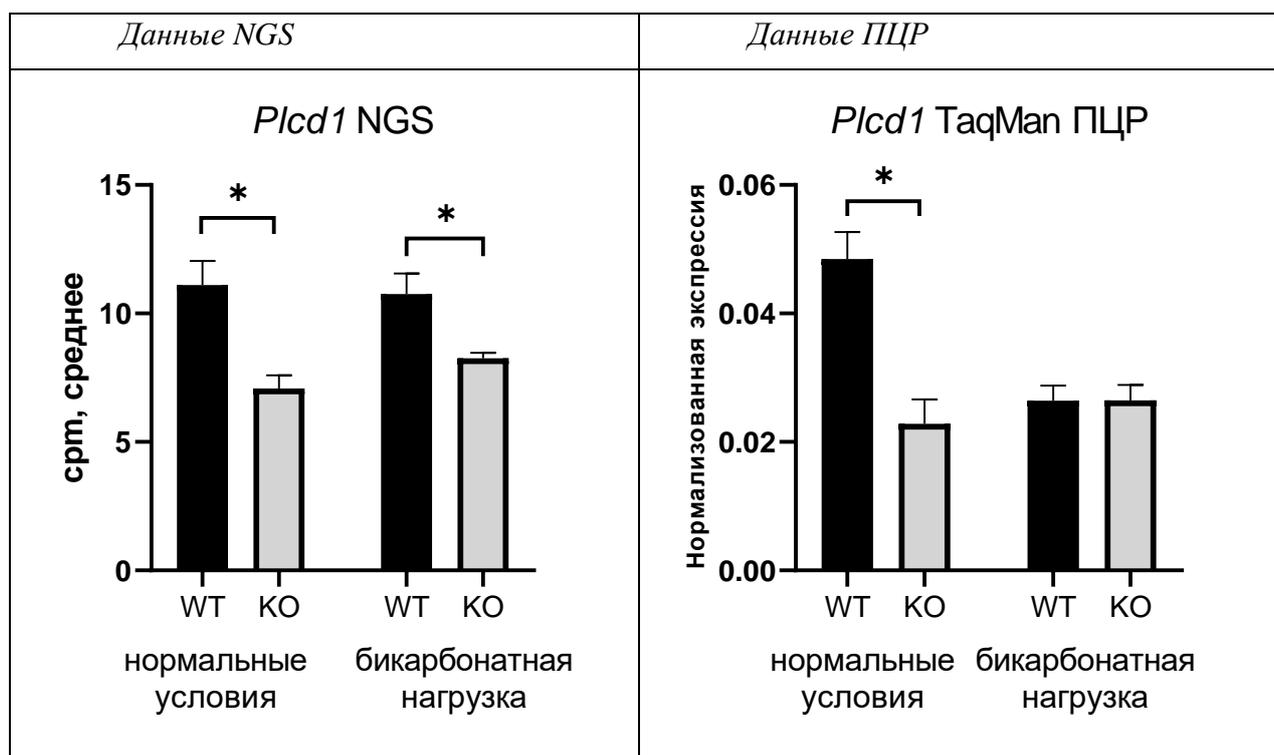


Рисунок 21 – Изменение экспрессии гена *plcd1* при нокауте гена *insrr* и в условиях алкалоза, * $p < 0,05$

6. *gapdh*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

На рис. 22 показаны результаты анализа экспрессии гена *gapdh* в почках мышей. 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, как и в случае с геном *plcd1* по данным ПЦР в реальном времени.

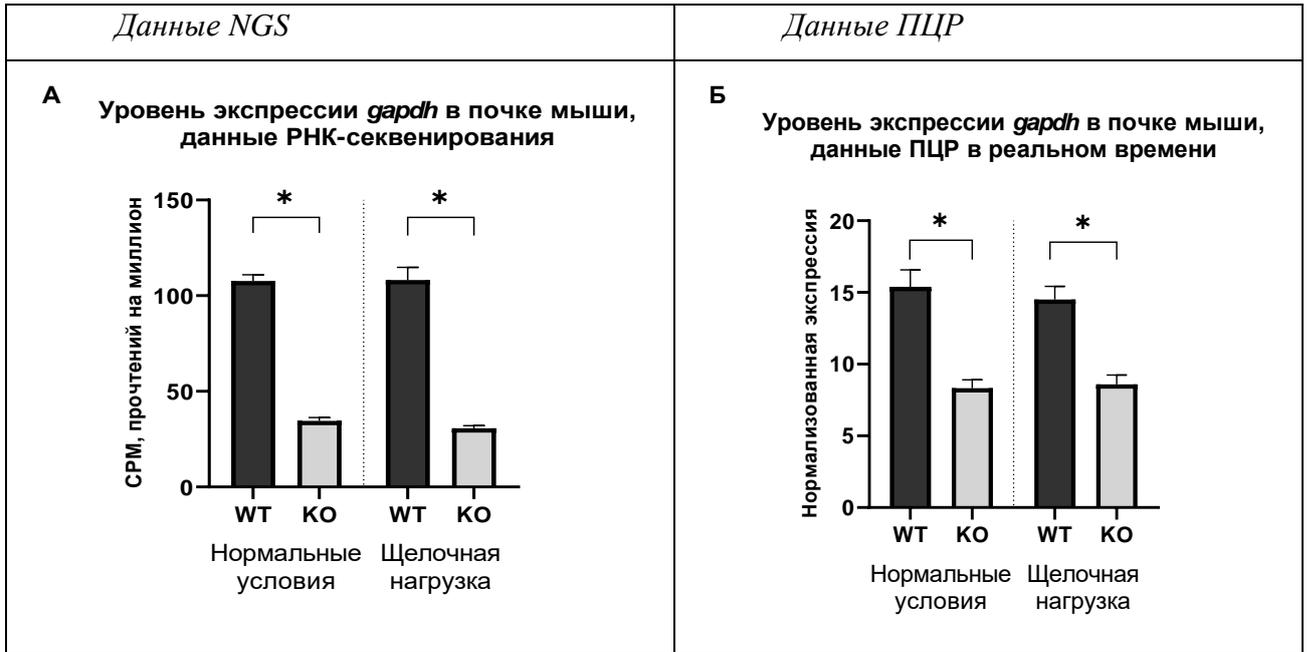


Рисунок 22 – Изменение экспрессии гена *gapdh* при нокауте гена *insrr* и в условиях алкалоза, $*p < 0,05$

Такое сильное изменение экспрессии гена *gapdh* представляло интерес для дальнейшего изучения, был проведен анализ экспрессии этого гена в различных органах мышей двух генотипов. Далее 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 [68] показаны на рис. 23, где видно, что снижение экспрессии гена *gapdh* у нокаутных по *insrr* животных характерно также для печени (рис. 23А) и мозга (рис. 23Б), все изменения достоверны ($p < 0.01$). Для печени и мозга показано снижение экспрессии гена *gapdh* на 30.5 % и 13.7 % соответственно.

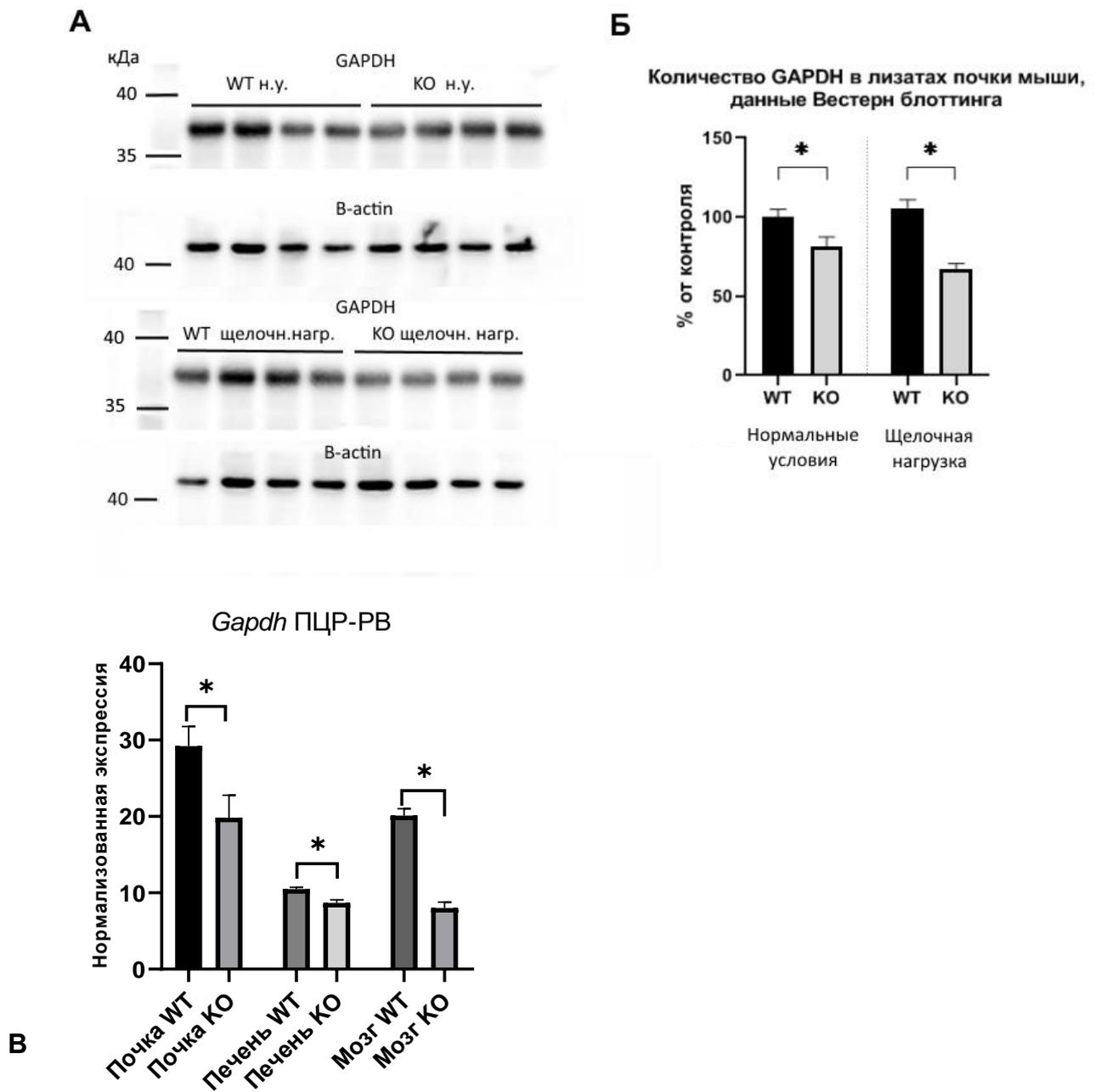


Рисунок 23 – А – Вестерн-блот анализ тотальных лизатов почек мышей. Слева указано положение белковых маркеров в геле, кДа, сверху указаны антитела, которыми производили окраску; Б – количественный анализ экспрессии глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (количество животных в каждой группе $n=4$, $*p < 0.05$). 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

7. *slc5a2, solute carrier family 5, member 2*

Натрий-глюкозный транспортер 2, SGLT2, участвует в регуляции кислотно-щелочного баланса в почке, так как его присутствие сопряжено с Na^+/K^+ АТФазой. Основной его функцией является реабсорбция глюкозы, что делает этот белок мишенью при терапии сахарного диабета.

Данные, свидетельствующие о снижении экспрессии глюкозного транспортера при нокауте гена *insrr* являются новыми и перспективными для дальнейшего исследования. На рис. 24 видно, что данные РНК-секвенирования указывают на снижение экспрессии SGLT2 в нокауте при обоих условиях содержания, а данные ПЦР в реальном времени подтверждают снижение экспрессии у нокаутных животных при нормальных условиях. Если предположить, что снижение экспрессии гена связано с количеством функционального белка в клетках почки, то у нокаутных по IRR животных глюкоза должна хуже реабсорбироваться в почке, что может приводить к снижению уровня глюкозы в крови.

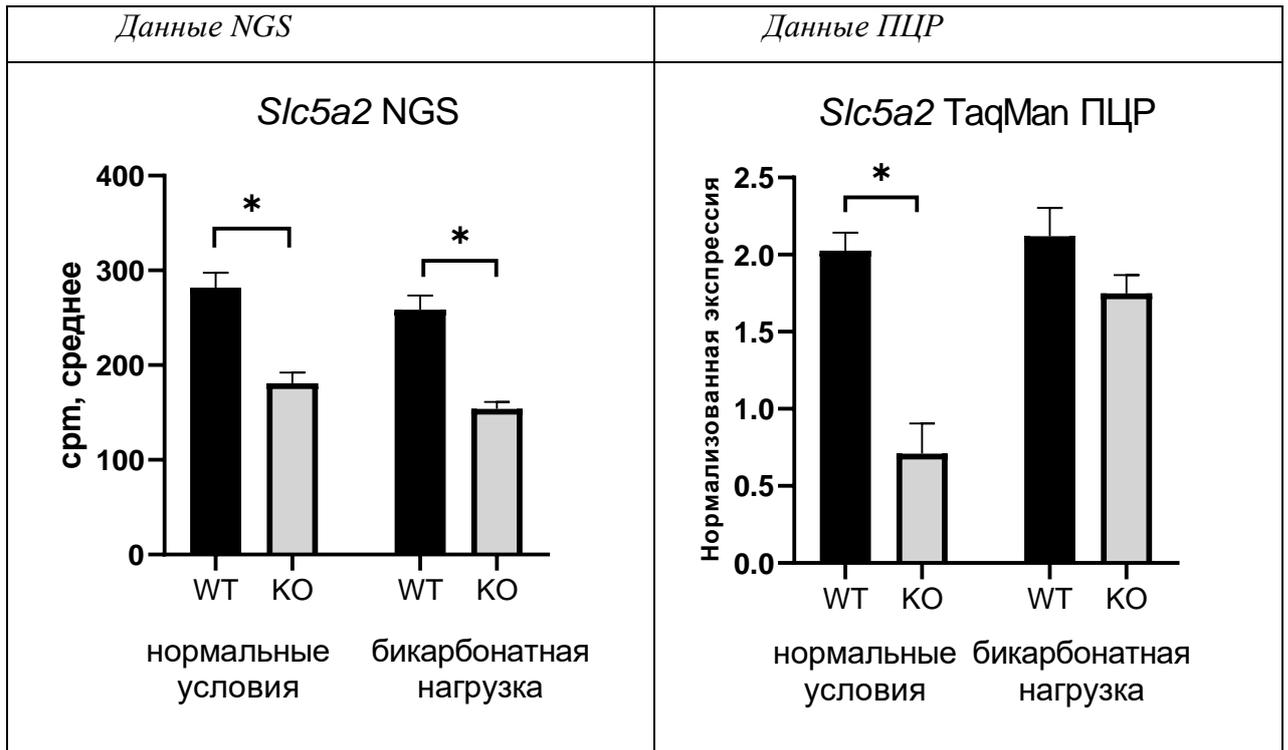
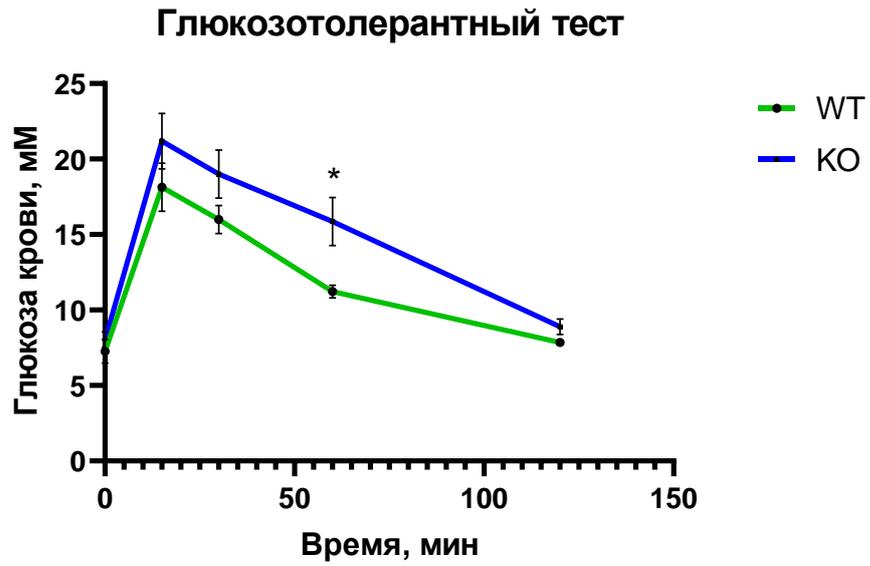
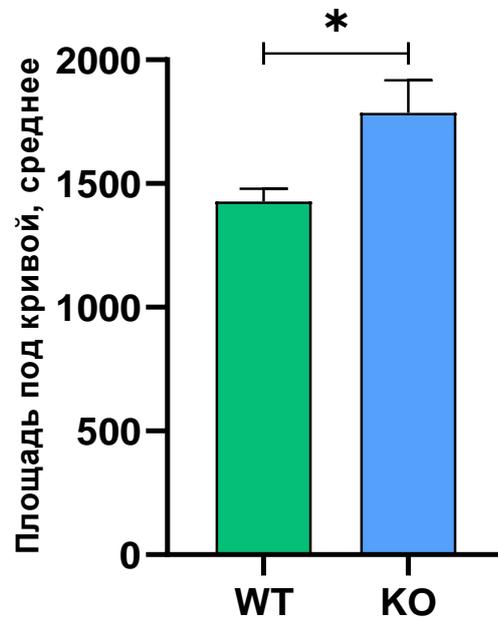


Рисунок 24 – Изменение экспрессии гена *slc5a2* при нокауте гена *insrr* и в условиях алкалоза, * $p < 0,05$

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. Результаты глюкозотолерантного теста отображены на рис. 25 и в таблице 8. Нокаутные животные показали общее повышение глюкозы в промежуточных и конечной точках измерения. Это не подтверждает гипотезу о снижении общего уровня глюкозы у нокаутных животных из-за пониженной экспрессии глюкозного транспортера SGLT2.



А



Б

Рисунок 25 – Глюкозотолерантный тест мышей, нокаутных по гену *insrr* (KO) и животных дикого типа (WT) А – кривые изменения Б – сравнение площади под кривой для двух генотипов.

Таблица 8. Статистический анализ Площадей под кривой, AUC между двумя группами животных КО против WT

Непарный t-тест	КО vs. WT
Значение P	0,0322
Значительно отличается (P < 0,05)?	Да
Одно- или двустороннее значение P?	Двустороннее
t, df	t=2,399, df=13
Насколько велика разница?	
Среднее значение столбца А (WT)	1428
Среднее значение столбца В (КО)	1786
Разница между средними (В - А) ± SEM	358,1 ± 149,3
95% доверительный интервал	35,58 to 680,6

8. *aqr6*, *aquaporin 6*

Аквапорин 6 является переносчиком молекул воды, локализован в собирательных трубках нефрона и участвует в поддержании осмоляльности мочи на физиологическом уровне. Локализация AQR6 во внутриклеточных пузырьках с H⁺-АТФазой в собирательных трубках почек предполагает, что AQR6 может участвовать в секреции кислоты. Уникальная анионная проницаемость AQR6, которая активируется при низком pH, подтверждает его возможную роль в секреции кислоты. Результаты РНК-секвенирования и ПЦР на рис. 26 показывают достоверное увеличение экспрессии в нормальных условиях у животных, нокаутных по гену *insrr*. Это можно объяснить тем, что при удалении щелочного сенсора IRR в собирательных трубках каким-то образом меняется pH-регуляция, что влияет не только на β-вставочные клетки, но на функции всего нефрона в целом. AQR6 сопряжен с транспортом протонов, и при нарушении реабсорбции бикарбоната может запускать увеличение секреции протонов в ультрафильтрат, что является теоретическим механизмом компенсации для поддержания равновесия кислот и оснований в почке.

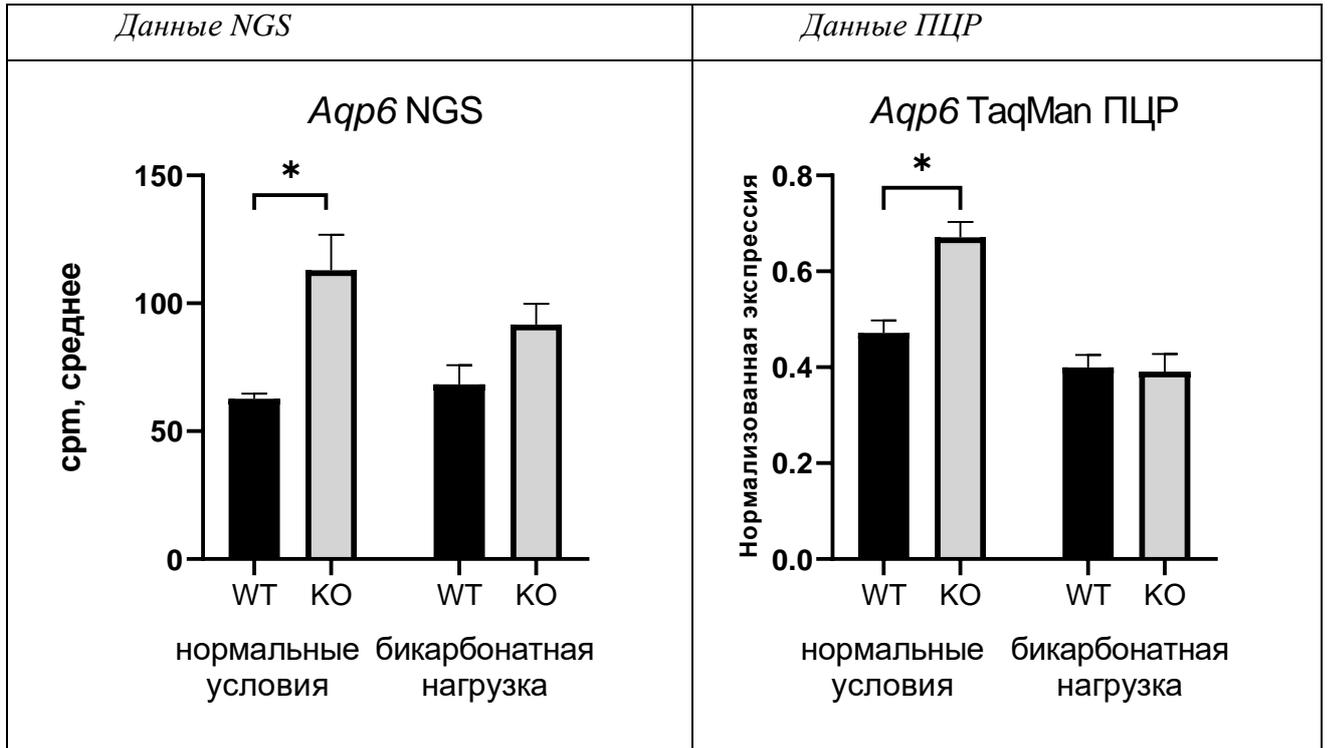


Рисунок 26 – Изменение экспрессии гена *aqr6* при нокауте гена *insrr* и в условиях алкалоза, * $p < 0,05$, в условиях бикарбонатной нагрузки разница недостоверна.

9. *rny3*, RNA, Y3 small cytoplasmic (associated with Ro protein)

Малая некодирующая РНК Y3 значительно изменяется при нокауте гена *insrr*, что подтвердилось методом ПЦР в реальном времени, экспрессию нормировали на ген сравнения ген «домашнего хозяйства» *Ap3d1*. Увеличение экспрессии Y3 РНК в нокауте может быть связано с общими изменениями фундаментальных процессов, репликации ДНК.

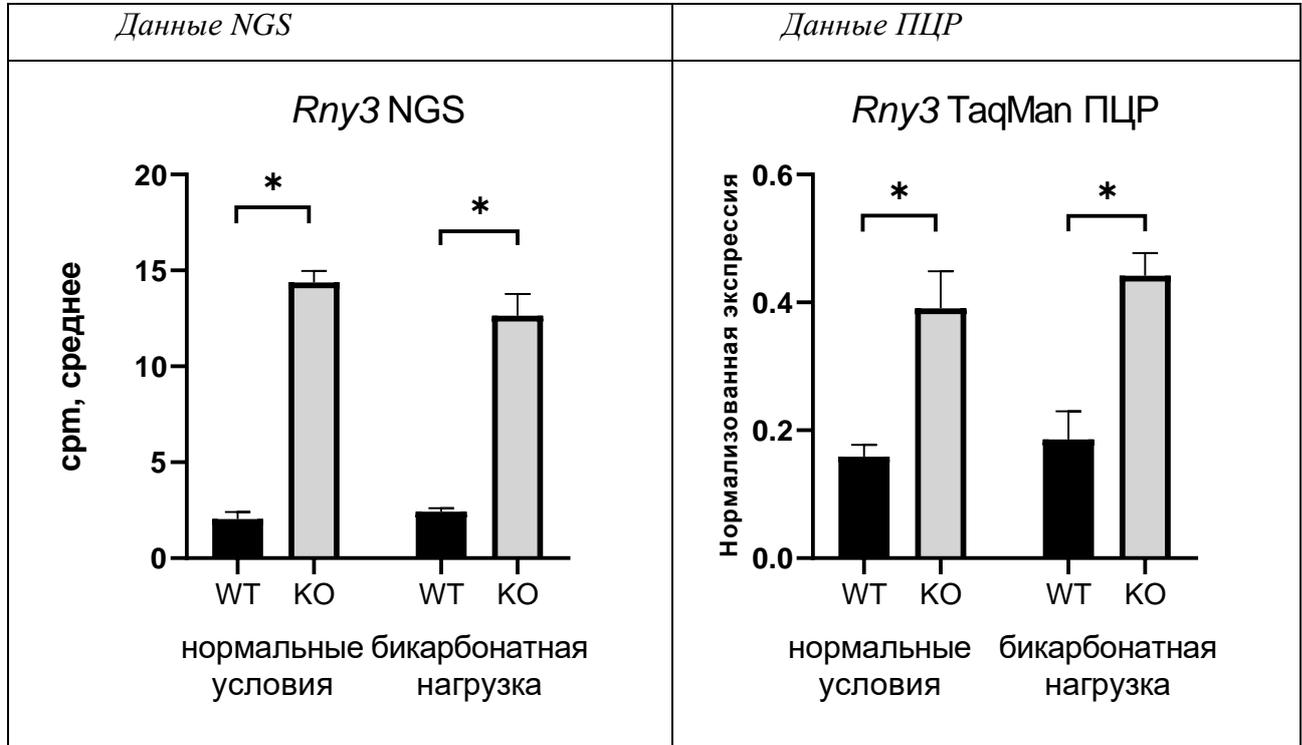


Рисунок 27 – Изменение экспрессии гена *rny3* при нокауте гена *insrr* и в условиях алкалоза, $*p < 0,05$

10. *lypd*, Ly6/Plaur domain containing 2

Члены суперсемейства белков лимфоцитарного антигена-6 (Ly6)/рецептора активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR) представляют собой богатые цистеином белки, характеризующиеся определенным расположением дисульфидных мостиков, которые создают трехпальцевый домен Ly6/uPAR (LU).. Этот ген был проанализирован на полученных РНК-секвенировании данных см. Рис.28.

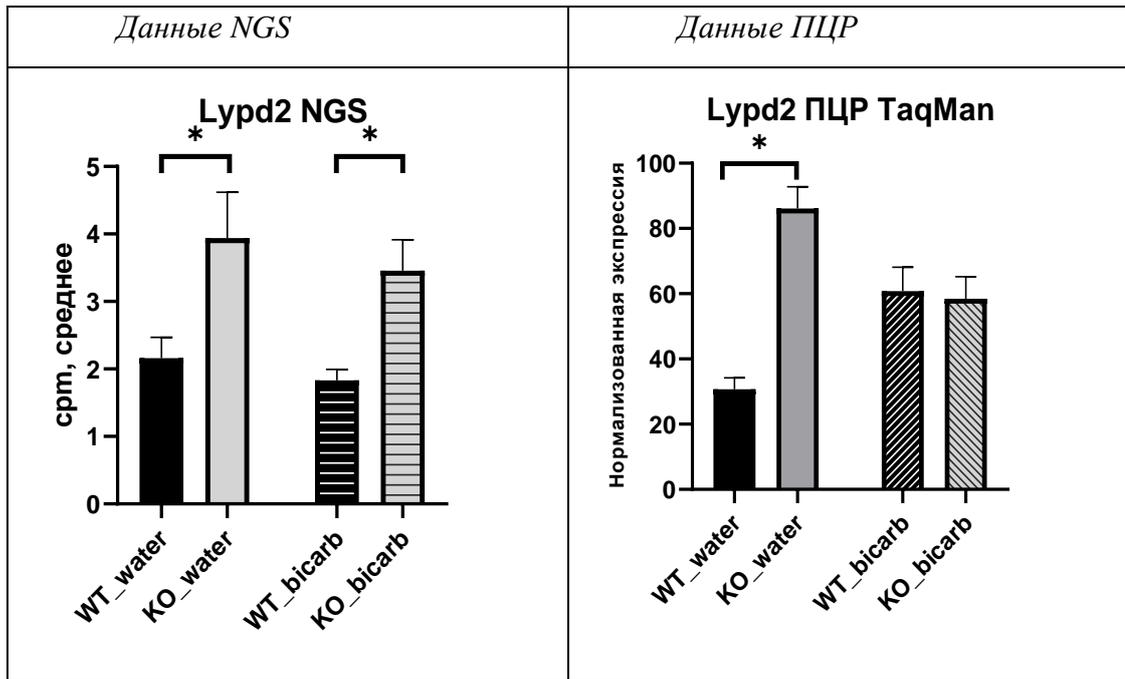
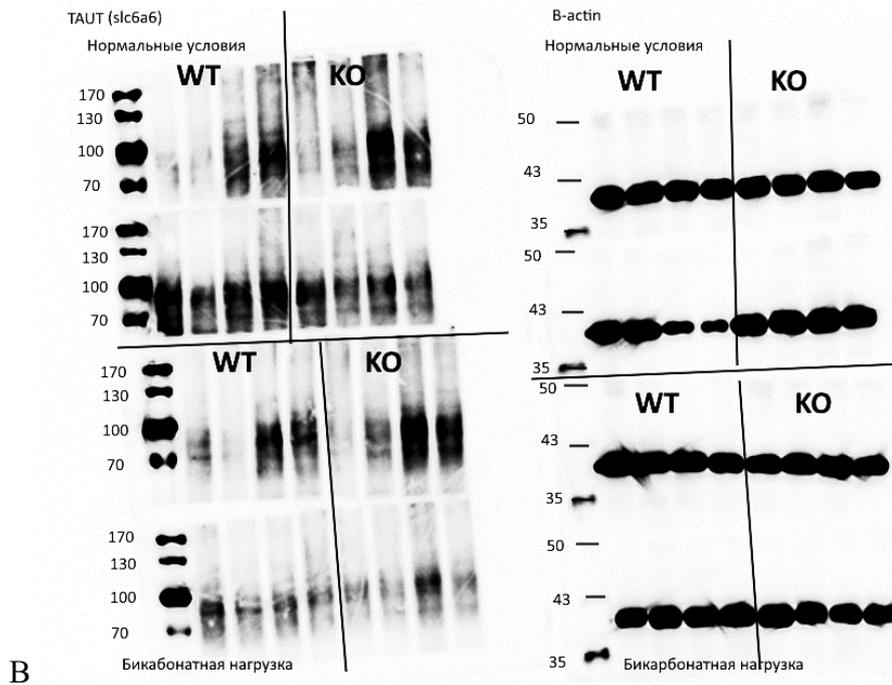
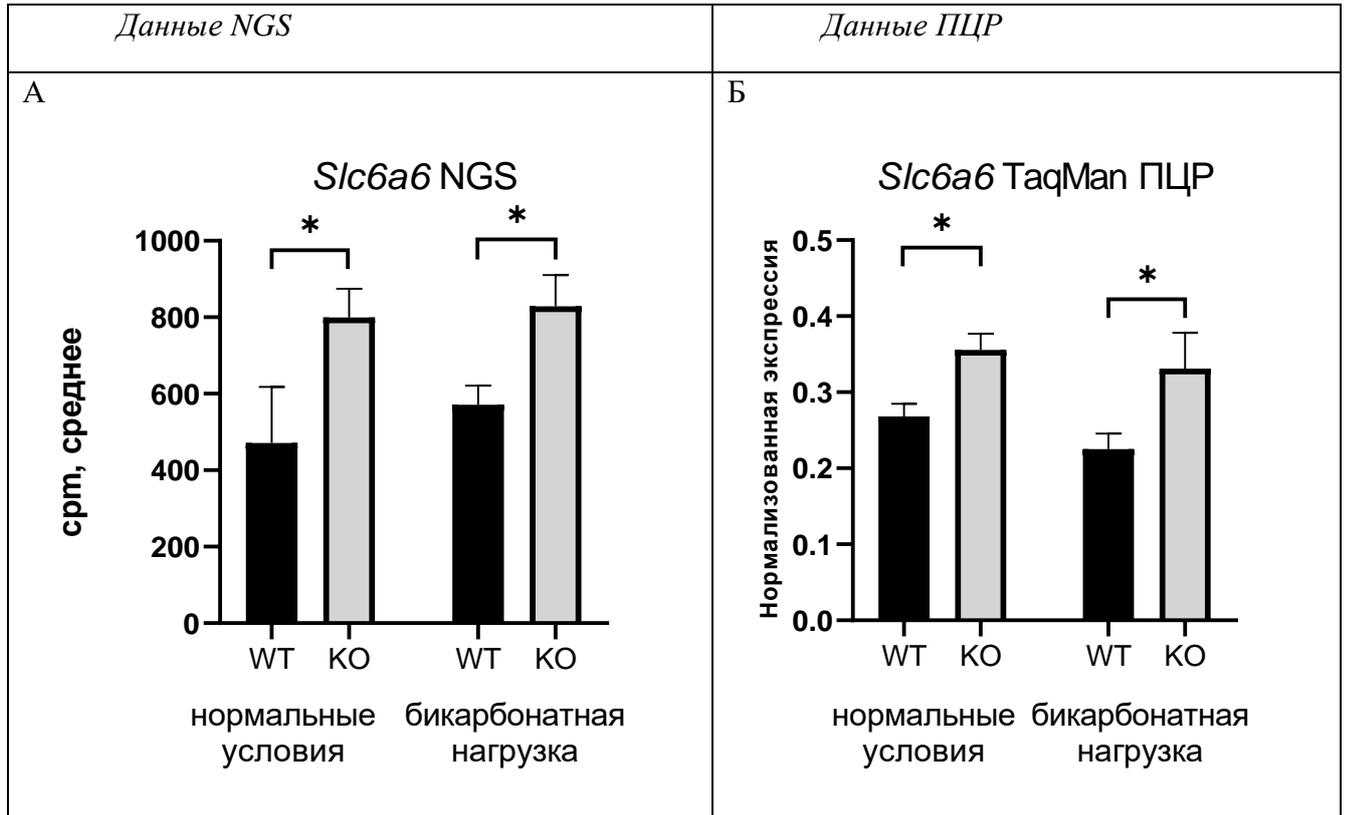


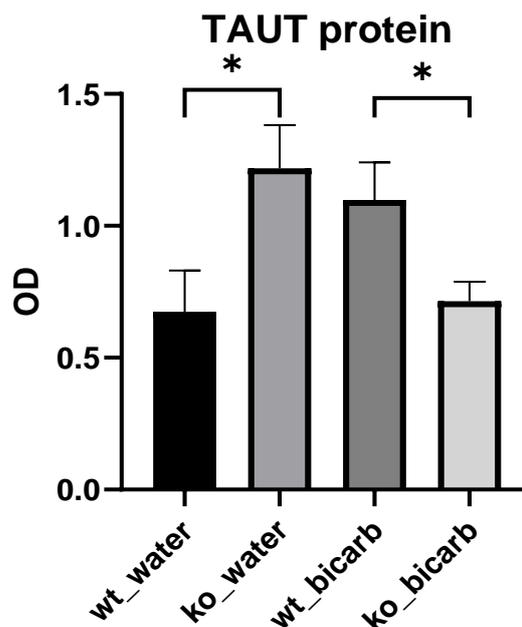
Рисунок 28 – Изменение экспрессии гена *lypd2* при нокауте гена *insrr* и в условиях алкалоза, * $p < 0,05$

На рис. 24 видно, что по данным NGS, экспрессия *lypd2* возрастает в нокаутных по IRR животных. Это же повышение экспрессии видно в нормальных условиях у нокаутных животных при проведении ПЦР в реальном времени. Можно предположить, что существует связь между белками, кодируемыми этими генами, но механизм пока неизвестен.

11. *slc6ab*, solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6

Полученные нами данные показывают повышение экспрессии гена *slc6ab* в почке при нокауте IRR, как в нормальных условиях, так и в условиях щелочной нагрузки. Повышение экспрессии видно и в данных РНК-секвенирования, и в данных ПЦР. Причина повышенной экспрессии TAUT пока неизвестна, но вероятно связь его и IRR.





Г

Рисунок 29 – Изменение экспрессии гена *slc6ab* при нокауте гена *insrr* и в условиях алкалоза А – данные транскриптомного анализа, Б – анализ данных ПЦР в реальном времени, * $p < 0,05$, В – Вестерн блоттинг белка TAUT в образцах почек мышей, уровень сигнала слева для белка TAUT, справа для референсного белка бета-актин, * $p < 0,05$, Г – обсчет результатов Вестерн блоттинга для белка TAUT.

1.7. Влияние нокаута рецепторной тирозинкиназы IRR на развитие эмбрионов мыши

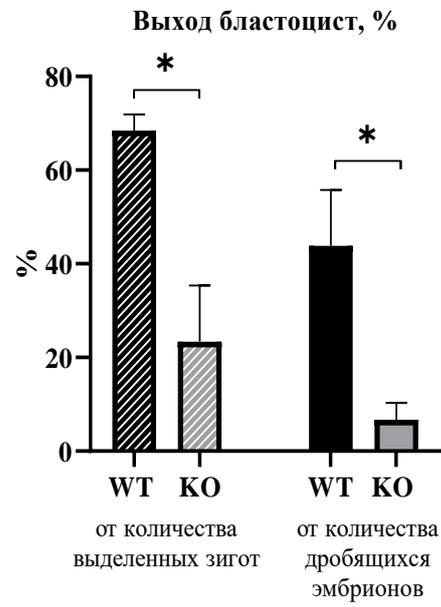
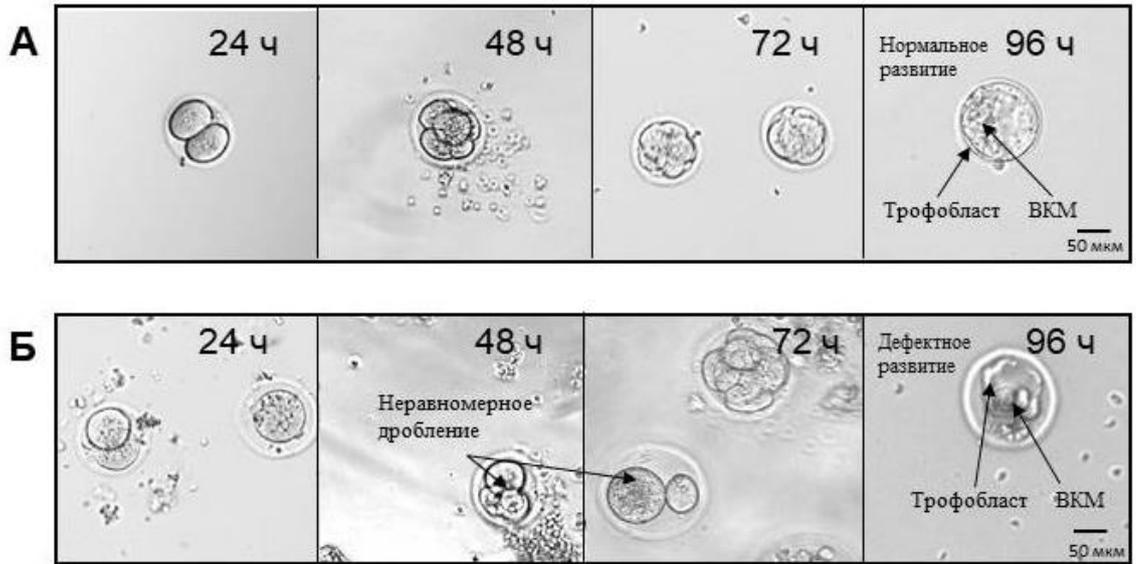
Изучили влияния нокаута гена *insrr*, кодирующего рецепторную тирозинкиназу IRR, на развитие преимплантационных эмбрионов мыши *in vitro*. В данной работе были проведены эксперименты по оценке развития преимплантационных эмбрионов мышей дикого типа и нокаутных по гену *insrr* с использованием МЕА-теста (mouse embryo assay). Параметром для оценки развития является выход бластоцист – процент образования бластоцист от общего числа выделенных зигот В эксперименте были использованы 12 самок дикого типа и 10 самок, нокаутных по гену *insrr*, потомков одного поколения, сводные данные представлены в таблице 9.

Бластоцисты у животных дикого типа имели типичное строение, выраженный трофобласт и внутриклеточную массу, все проходили вылупление (рис. 30А). Для зигот, извлеченных из мышей, нокаутных по гену *insrr*, наблюдалась задержка в развитии, а также неравномерное дробление blastomeres (см. рис. 30Б, 48 и 72 ч). Эмбрионы, достигшие стадии бластоцисты имели аномальное строение, внутриклеточная масса и трофобласт были неявно выражены, вылупление из оболочки происходило не во всех случаях. Оценку развития эмбрионов осуществляли с помощью индекса выхода бластоцист – процента образования бластоцист из общего количества извлеченных зигот.

Результаты этих экспериментов показали, что выход бластоцист у нокаутных по гену *insrr* животных значительно ниже, чем у животных дикого типа, 6,7 % от общего количества извлеченных клеток у нокаутных животных и 43,8 % у животных дикого типа (t-тест, $p < 0,05$) (рис. 30 В). Отличалось и количество извлеченных зигот у мышей дикого типа и нокаутных по *insrr* – 231 клетка из 12 самок, и 119 клеток из 10 самок, соответственно (табл. 9). В среднем количества извлеченных зигот из одной самки составили 18,9 зигот для мышей дикого типа, и 11,8 зигот для нокаутных по *insrr* мышей (рис. 30 Г). Процент развития эмбрионов (количество дробящихся зигот) у нокаутных животных также был ниже – 34,9 %, тогда как у мышей дикого типа – 62,7 % (рис. 32 В). Если рассчитывать выход бластоцист от количества двухклеточных эмбрионов, то он составил 68,4 % и 23,3 % для мышей дикого типа и нокаутных по *insrr*, соответственно (рис. 30 Д).

Если суммировать данные трех экспериментов для каждого генотипа (табл. 6), то у животных дикого типа четырехклеточные эмбрионы образовались в количестве 108 из 124 дробящихся клеток, морулы в количестве 96 штук. Для нокаутных по IRR животных образовалось 30 четырехклеточных эмбрионов из 38 двухклеточных, количество морул – 22 штуки. У нокаутных животных наблюдалось большее количество дефектных зигот в процентном соотношении от общего количества выделенных клеток (рис. 30 Е). Дефектными считали клетки, в которых наблюдались множественные вакуоли, гранулы, деформация цитоплазмы. Нарушенное развитие, а именно, неравномерное дробление, остановка развития на различных стадиях, чаще наблюдались у нокаутных эмбрионов (рис. 30 Б). Качество бластоцист также различалось: B12Bb/B12Bc/B12Cc в нокаутных эмбрионах, и B14Ab/B14Aa в эмбрионах дикого типа.

В условиях МЕА-теста наблюдали у нокаутных животных более низкий процент развития (количество дробящихся клеток от общего числа извлеченных зигот) и более низкие значения выхода бластоцист, в том числе от количества двухклеточных эмбрионов, чем у животных дикого типа (рис. 30 Д). В контроле дикого типа был невысокий выход бластоцист 68,4 % от количества дробящихся клеток. Это можно объяснить тем, что эксперимент проводился на линии мышей C57Bl/6J, тогда как протокол МЕА-теста предполагает использование линии CBA, либо гибридов первого поколения C57Bl/6J-CBA. Большее количество извлеченных зигот у мышей дикого типа по сравнению с мышами, нокаутными по гену *insrr* (18,9 и 11,8 зигот в среднем из одного животного, соответственно) может быть связано с активацией экспрессии рецептора IRR в яичниках мышей дикого типа под действием гонадотропина и указывает на потенциальную роль рецептора IRR в процессах овуляции. Наблюдаемый эффект может быть связан с активностью IRR как сенсора щелочного pH на преимплантационных стадиях развития или низким качеством исходных зигот ввиду его активности на более ранних этапах – в оогенезе.



В

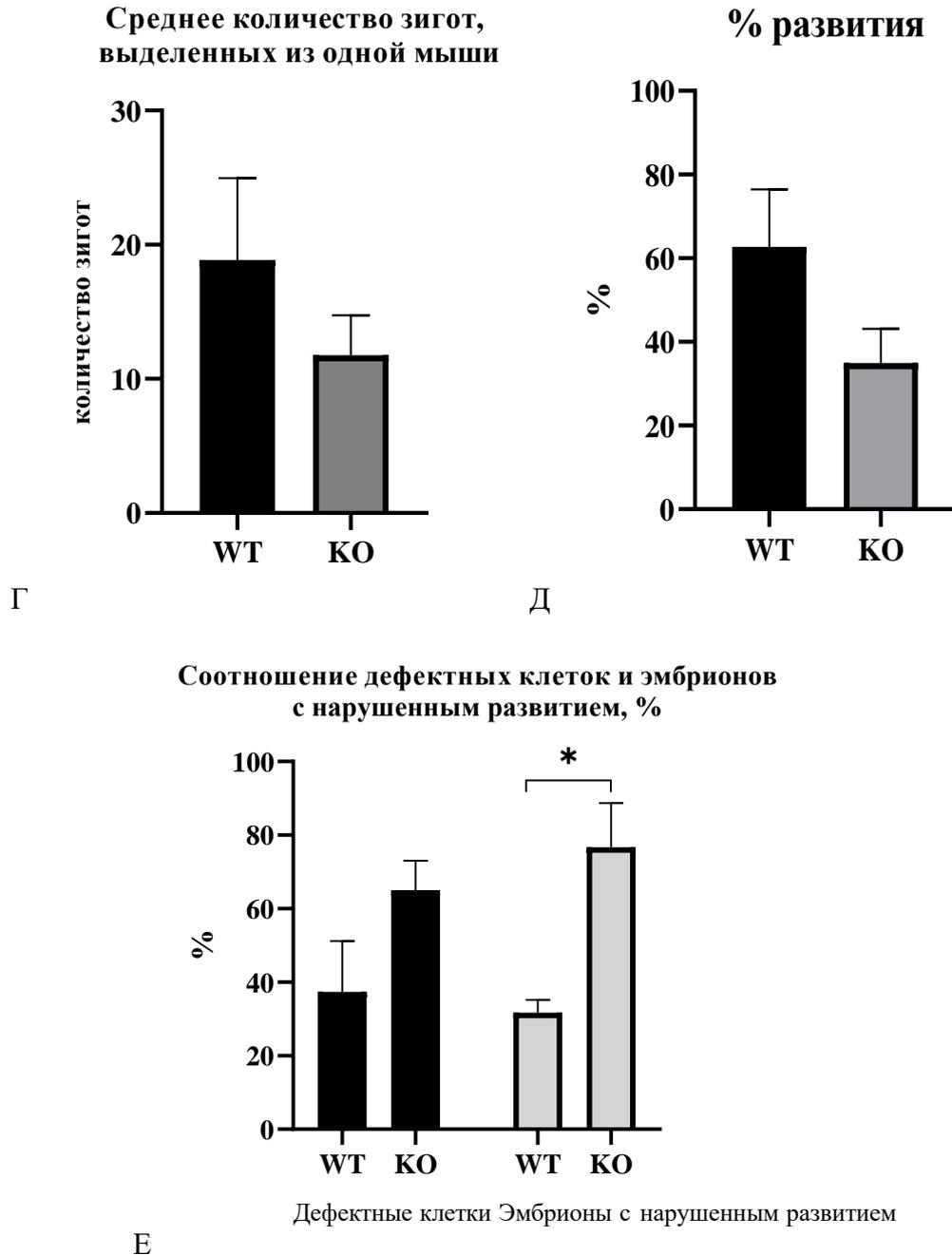


Рисунок 30 – Анализ развития преимплантационных эмбрионов мыши: панель изображений преимплантационных эмбрионов через 24, 48, 72, 96 часов после извлечения зигот. А – эмбрионы мышей дикого типа, Б – эмбрионы мышей, нокаутных по гену *insrr*. Стрелками обозначены трофобласт и ВКМ – внутриклеточная масса; Для нокаутных преимплантационных эмбрионов показаны отклонения от нормального развития – неравномерное дробление. В – Гистограмма выхода бластоцист от количества выделенных зигот и от количества дробящихся эмбрионов, в процентном соотношении (* $p < 0,05$); Г – гистограмма среднего количества зигот, выделенных из одной самки мыши; Д – % развития, количество дробящихся зигот, в процентном соотношении от общего количества выделенных зигот; Е – гистограмма процентного соотношения дефектных клеток и эмбрионов с нарушенным развитием. Черным цветом указано ко-

личество дефектных клеток, в которых наблюдались множественные вакуоли, гранулы, деформация цитоплазмы. Серым – эмбрионы с нарушенным развитием (неравномерное дробление бластомеров, остановка развития на различных стадиях) (* $p < 0,05$). Отрезками отмечены значения среднеквадратической ошибки (SEM). WT – мыши дикого типа, KO – мыши, нокаутные по гену *insrr*.

Таблица 9. Суммарные данные MEА-теста, полученные в результате трех экспериментов, для мышей дикого типа (WT) и нокаутных по гену *insrr* (KO).

	WT	KO
Количество мышей	12	10
Количество извлеченных зигот	231	119
Количество двухклеточных эмбрионов	124	38
Количество четырехклеточных эмбрионов	108	30
Количество морул	96	22
Количество бластоцист	83	10

Также проводили оценку развития гетерозиготных эмбрионов, для этого скрещивали диких и нокаутных животных разного пола. В экспериментах были использованы 8 нокаутных по IRR самок и 6 самок дикого типа. При скрещивании нокаутных самок с дикими самцами и диких самок с нокаутными самцами получили сопоставимые значения выхода бластоцист. В обоих случаях выход бластоцист был ниже, чем у животных дикого типа, но выше, чем у нокаутных животных. У нокаутных и диких самок выход гетерозиготных бластоцист составил 14 и 18 % от общего числа извлеченных клеток, и 35 и 44 % от числа поделившихся клеток, соответственно. При этом, качество сперматозоидов нокаутных самцов не связано с низким выходом бластоцист, так как у нокаутных и диких самцов были сопоставимые показатели в условиях MEА-теста.

2. Обсуждение

Кислотно-щелочной баланс является важным элементом гомеостаза и обеспечивает жесткий контроль как внеклеточного, так и внутриклеточного рН. Отклонения от нормы, такие как ацидоз или алкалоз, могут серьезно повредить организм, поэтому в клетках существуют компенсаторные механизмы, активируемые различными белками. Для изучения этих процессов используют животные модели, в частности мышей [125, 156].

В отличие от родственных структур (инсулинового рецептора и рецептора инсулиноподобного фактора роста 1), которые распространены в различных тканях, рецептор IRR демонстрирует избирательную активность. Его биосинтез ограничен специфическими клеточными группами в отдельных органах. Наибольшая концентрация IRR зафиксирована в дистальных отделах почечных канальцев, где он присутствует исключительно в бета-вставочных эпителиоцитах. Эти специализированные клетки непосредственно взаимодействуют с ультрафильтратом, чей рН (в отличие от стабильных показателей крови) подвержен значительным колебаниям, включая смещение в щелочную область, что делает ее рН-сенсором, потенциально вовлеченным в регуляцию кислотно-щелочного баланса [165]. IRR стал уникальным объектом исследований, поскольку ранее не существовало документально подтвержденных рецепторных систем, специфически реагирующих на щелочной рН (при том, что науке известны рН-чувствительные ионные каналы). Обнаружение его сенсорной функции в отношении щелочной среды, вероятно, потребует пересмотра классических теорий регуляции кислотно-основного состояния.

Для изучения физиологической роли рецептора IRR была создана уникальная линия нокаутных мышей по гену *insrr*. На данный момент фенотип мышей, у которых нокаутирован ген *insrr*, изучен недостаточно. Отсутствие активируемого щелочью рецептора IRR может сказаться на чувствительности главного органа экскреции – почек к изменениям рН. Актуальной темой является дополнительное изучение доказанного нарушения секреции бикарбоната в мочу у нокаутных животных при индуцированном алкалозе [47], что свидетельствует о наличии компенсаторного механизма регуляции в почках. Генетические изменения, происходящие при алкалозе, до сих пор не были описаны, так как не проводилось фундаментальных исследований на этот счёт. Применение животной модели с нокаутом гена *insrr* позволит выявить взаимодействия этого рецептора с другими рН-чувствительными белками, а также более глубоко исследовать механизм регуляции кислотно-щелочного баланса в организме.

Проведенные ранее исследования [53] выявили, что активация IRR внеклеточным слабощелочным рН (гидроксил ионами) демонстрирует ключевые особенности классического рецептор-лигандного взаимодействия:

Специфичность реакции

- IRR проявляет селективную чувствительность к щелочной среде, тогда как структурно родственные рецепторы (инсулиновый, IGF и EGFR) остаются индифферентными к кислотно-щелочным колебаниям
- Отсутствие перекрестной реактивности: рецептор не отвечает на стимуляцию лигандами, характерными для других членов семейства
- Активационный процесс имеет выраженную концентрационную зависимость с кооперативным эффектом. Воздействие OH⁻-ионов индуцирует структурные преобразования в рецепторной молекуле, изменяя ее пространственную конфигурацию.

Экспериментально подтверждено, что фосфорилирование IRR инициирует каскад внутриклеточных сигналов, аналогичный инсулиновой сигнальной передаче. Дополнительно идентифицированы ключевые домены экстраклеточного фрагмента рецептора, ответственные за его активацию [54].

Функция IRR как сенсора щелочной внеклеточной среды подтверждается результатами физиологических экспериментов. У мышей, в которых целенаправленно инактивация гена *insrr*, кодирующего рецептор IRR, наблюдались нарушения в регуляции кислотно-щелочного равновесия. В частности, у этих нокаутных мышей, подвергнутых щелочной нагрузке, развивался метаболический алкалоз, а также отмечалась сниженная секреция бикарбоната в мочу [2]. Животные дикого типа и те, у кого был нокаут гена *insrr*, проявили различные реакции на острый экспериментальный алкалоз, вызванный внутривенным введением 1,3% раствора бикарбоната в кровотоки [1]. У мышей с нокаутом IRR также фиксируется компенсация алкалоза, что видно по снижению уровня pH в крови. Однако такая компенсация не происходит за счет увеличенной секреции бикарбоната в мочу. Вместо этого наблюдается повышение концентрации углекислого газа (CO₂) в крови, что, вероятно, связано с замедлением дыхания или изменениями в уровне метаболизма. У мышей, нокаутных по гену IRR, обнаружен особый поведенческий фенотип, заключающийся в дефиците агрессивно-оборонительного поведения животных [211]. Насколько данный фенотип связан с функцией IRR в качестве физиологического сенсора pH, остается предметом изучения.

Обработка клеток, экспрессирующих рецептор IRR, средой со слабощелочным pH вызывает активацию внутриклеточных сигнальных белков, которые активируются при обработке клеток инсулином. При активации IRR наблюдается фосфорилирование IRS-1 и протеинкиназы B (Akt/PKB). Но в отличие от обработки инсулином никаких изменений в уровне фосфорилирования белков ERK 1,2 обнаружено не было. Также была показана активация щелочной средой эндогенного рецептора IRR в клетках поджелудочной железы MIN6, которая блокировалась добавлением ингибитора киназной активности *linsitinib*, специфичного ко всем трем членам се-

мейства рецептора инсулина. Активация IRR в клетках MIN6 вызывала также рН-зависимую активацию внутриклеточного сигнального белка IRS-1. Интересно, что при обработке щелочью клеток MIN6 не было обнаружено изменение фосфорилирования внутриклеточных сигнальных белков Akt и ERK 1,2 [51]. В нервной системе мРНК рецептора IRR присутствует в сенсорных и симпатических нейронах, где он со-экспрессируется с тирозинкиназным рецептором фактора роста нервов (NGF) TrkA [5]. Тирозинкиназный рецептор TrkA (тропический рецептор к нервному фактору роста A) — это тип рецептора на поверхности клеток, который принадлежит к семейству рецепторов тирозинкиназ. Он обладает ключевой ролью в нейробиологии и поддерживает развитие и выживание нейронов. Когда NGF связывается с TrkA, это запускает автокиназную активность рецептора, что приводит к его фосфорилированию. Это, в свою очередь, инициирует каскад сигналов внутри клетки, который способствует клеточной выживаемости, росту аксона и увеличению нейрональной пластичности. Нарушения в сигнализации через TrkA могут приводить к различным неврологическим и психиатрическим заболеваниям [45]. Экспрессия IRR и TrkA начинается на перинатальной стадии развития в нейронах базальных ядер переднего мозга, при этом мРНК обоих рецепторов выявляется в развивающейся нервной системе исключительно в сочетании. Кроме того, при совместной экспрессии с IGF-IR, IRR ассоциировался с увеличением индекса апоптоза. Также была подтверждена экспрессия IRR в нейронах спинномозговых ганглиев мышей с помощью метода РНК-секвенирования отдельных клеток, где также наблюдался высокий уровень экспрессии рецептора TrkA [5]. Линия мышей, нокаутных по гену *insrr* была получена ранее, и исследована в работах Т. Kitamura и S. Nef [98, 134]. Kitamura и соавторы выяснили, играет ли IRR физиологическую роль в развитии бета-клеток и регуляции секреции инсулина, у мышей нокаутных по IRR. Было показано, что морфология островков, масса бета-клеток и их секреторная функция не изменены у мышей, нокаутных по IRR. Секреция инсулина, стимулируемая глюкозой, и эмбриональное развитие бета-клеток проходят нормально у мышей, лишенных IRR. Nef и соавторы показали, что инактивация трех генов рецепторов: инсулинового рецептора (IR), рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGFR) и рецептора, подобного инсулиновому рецептору (IRR) – обнаруживают XY мышей у которых гонады развиваются в яичники и демонстрируют женский фенотип.

Из проведенного гистологического исследования с помощью микроскопии и морфометрической оценки поперечных срезов почек на уровне почечной лоханки, окрашенных гематоксилином-эозином, видно, что нокаут гена рецепторной тирозинкиназы IRR не привел к каким-либо патологическим нарушениям в строении почек [72]. Собирательные трубки у животных дикого типа имели больший просвет, чем у нокаутных мышей по гену *insrr*. При этом бикарбонатная нагрузка приводила к увеличению просвета собирательных трубок у *insrr*^{-/-} жи-

вотных. Вероятно, щелочная нагрузка изменяет клеточный профиль собирательного протока, что может включать пролиферацию клеток и изменения экспрессии рецепторов апикальной мембраны протока [73].

Нокаут данного гена не привел к изменению площади почечного тельца, однако в диком типе при экспериментальном алкалозе площадь клубочка значительно увеличивается. Увеличение площади клубочков связывают с гломерулярной гипертензией и гиперфилтрацией [183]. Изменение площади клубочка при алкалозе может быть связано с глюкозно-натриевым транспортером SGLT2, так как изменения экспрессии этого гена наблюдались при нокауте IRR, влияние которого на нарушение кислотно-щелочного гомеостаза в почке делают его активно изучаемой мишенью для веществ-ингибиторов [34]. Ингибиторы белка SGLT2 такие как дапаглифлозин, канаглифлозин и эмпаглифлозин, уменьшают реабсорбцию глюкозы в почках, что приводит к усилению экскреции глюкозы с мочой и последующему снижению концентрации глюкозы в плазме и концентрации гликозилированного гемоглобина [133]. Эти вещества вызывают снижение площади клубочков, вызванных нарушением функции SGLT2 [118]. При оценке толщины паренхимы почек в ходе моделирования алкалоза было выявлено увеличение толщины паренхимы как у нокаутных животных, так и у животных дикого типа. Увеличение толщины паренхимы связывают с острым повреждением почек [115], а уменьшение толщины с хронической болезнью почек [80]. Вероятно, изменение морфологии почек мышей является предвестником начинающегося патологического изменения.

Конечная оценка говорит о том, что размер почек у нокаутных мышей оказался меньше, чем у мышей дикого типа. Эти результаты могут свидетельствовать о возможном влиянии нокаута гена *insrr* на размер и функционирование почек, однако требуются дополнительные исследования для точного понимания механизмов данного влияния. Возможно использование данной животной модели для изучения влияния транспорта бикарбоната, либо для моделирования метаболического алкалоза и изучение его влияния на организм. В целом, нокауты генов, ответственных за транспорт ионов в почке являются широко распространенной темой и представляют ценность для моделирования тех или иных патологических состояний [12]. Так, например, у мышей, нокаутных по натрий-протонному NHE3-транспортеру, нарушен водный баланс и осмоляльность мочи [12]. Нокауты некоторых ионных каналов, например котранспортера NaK2Cl (NKCC2) и калиевого транспортера ROMK, вызывают почечную недостаточность и гидронефроз, несовместимые с жизнью животных [117, 177]. Благодаря наступлению «эпохи нокаутов» появляются новые знания о физиологии почки, в том числе и о молекулярной физиологии. С помощью методов клонирования и генетической модификации генов, получены ответы на вопросы о регуляции кислотно-щелочного баланса в почках. Авторы надеются, что жи-

вотные, нокаутные по гену рецепторной тирозинкиназы IRR, окажутся моделью для изучения подобных процессов.

Макрофагальная активность зависит от внешних и внутренних условий в тканях организма [38]. В настоящее время установлено, что рН является одним из механизмов, посредством которого определяется поляризация макрофагов в фенотип провоспалительный, либо в фенотип противовоспалительный [200]. Возможность макрофагов реагировать на рН внеклеточной среды используется для доставки лекарств с помощью наночастиц. Полимерные частицы, обладающие чувствительностью к рН эффективно попадали в макрофаги, и таким образом производилась адресная доставка лекарств в этот тип клеток [76]. Незначительное снижение рН иногда может оказывать заметное влияние на активацию NF-κB, который является главным фактором транскрипции воспаления, и секрецию цитокинов. Участки воспаления имеют низкий внеклеточный рН, и при моделировании на клеточных линиях макрофагов сниженного рН, наблюдали изменение активности фактора NF-κB, а так же была значительно снижена секреция провоспалительных цитокинов (ФНО или ИЛ-6) на клеточной линии мышинных макрофагов J774A.1 [74]. На этой же клеточной линии показали, что кислотная обработка способна поляризовать макрофаги в макрофаги типа M2 посредством увеличения экспрессии *Ym1*, *Tgm2*, *Arg1*, *Fizz1* и *IL-10*. Метаболический анализ макрофагов мышей (J774A.1) при рН 2,0 и рН 4,0, по сравнению с рН 7,0, способствует экспрессии внутриклеточных метаболитов ацетилхолина, холина, прохлорперазина, L-лейцина и бисфенола А, 2-амино-3-метилимидазо[4,5-f] хинолона в макрофаге с поляризацией M2 [141].

Стимуляция макрофагов эндотоксином и/или цитокинами отвечает за экспрессию индуцируемой изоформы синтазы оксида азота (iNOS). Поскольку макрофаги подвергаются воздействию низкого рН в микросреде воспалительных поражений, была исследована потенциальная роль кислого рН как дополнительного регулятора iNOS. Замена культуральной среды перитонеальных макрофагов крыс с рН 7,4 на среду с рН 7,0 повысила активность iNOS, что отразилось в 2,5-кратном увеличении накопления нитрита. Транскрипция гена iNOS, вызванная низким рН среды, включала активацию фактора транскрипции NF-κB. Дополнительно наблюдалась повышенная биоактивность ФНО-α в среде макрофагов, подвергнутых воздействию рН 7,0. Воздействие кислой микросреды на макрофаги в воспалительных очагах приводит к повышению регуляции активности iNOS посредством активации NF-κB [22].

Также было обнаружено, что состояние поляризации макрофагов зависит от рН при исследовании остеоиммунномодуляции. Кислая среда (рН 6,6) имела тенденцию поляризовать макрофаги к фенотипу M2, о чем свидетельствует повышенная секреция аргиназы-1 (Arg-1), пониженная экспрессия генов, связанных с M1, таких как CD86, фактор некроза опухоли-α (ФНО-α), интерлейкин-27 (IL-27) и IL-1β, а также повышенная экспрессия гена поверхностного маркера

M2 CD206. Щелочная среда (pH 8,2) приводила к поляризации M1 макрофагов, о чем свидетельствует повышенная продукция индуцируемой синтазы оксида азота и повышенная экспрессия генов, связанных с M1, таких как CD11c, TNF- α , IL-1 β и IL-6. Более того, экспрессия генов факторов роста, включая костный морфогенетический белок-2 (BMP-2), BMP-6 и онкостатин-M (OSM), а также пути толл-подобных рецепторов (TLR) (TLR-3, TLR-4 и MyD88), также были повышены при pH 8,2. Кроме того, было обнаружено, что щелочная среда (pH 8,2) проявляет положительный остеоиммуномодулирующий эффект, поскольку микросреда, созданная путем культивирования макрофагов в культуральной среде со значением pH 8,2, способствовала активности щелочной фосфатазы (ALP), продукции коллагена (Col), минерализации, а также экспрессии генов ALP, Col-I и остеокальцина (OCN) в остеобластах. Считается, что это связано с повышенной продукцией BMP-6 и OSM макрофагами в ответ на щелочную среду (pH 8,2). Остеоиммуномодулирующий эффект кислой среды (pH 6,6) оказался слабее [22]. В совокупности результаты указывают на то, что поведение макрофагов, такое как жизнеспособность, морфология и состояние поляризации, может модулироваться внеклеточным изменением pH.

Последние достижения в технологии секвенирования ДНК, полученные секвенированием следующего поколения (NGS), позволили создать различные молекулярные карты, включая геномы, транскриптомы и эпигеномы. Среди них транскриптомные данные на основе NGS, называемые RNA-seq (или профилирование экспрессии с помощью высокопроизводительного секвенирования), являются одним из наиболее распространенных типов данных согласно статистике [19]. RNA-seq стал основным исследовательским инструментом для профилирования различных РНК во многих исследовательских областях. Потенциальных ошибок выборки можно избежать, тщательно изучив данные последовательности РНК перед последующим анализом, таким как анализ дифференциально экспрессируемых генов (DEG) [170].

Подход, используемый в данной работе – РНК-секвенирование почек мышей, которое проводилось на мышах дикого типа и нокаутных по гену *insrr* [70]. Дополнительно были использованы два условия содержания животных – нормальные условия и экспериментальный алкалоз, индуцируемый добавлением 250 мМ бикарбоната натрия в воду для питья [66]. Дальнейшие исследования включали в себя РНК-секвенирование и ПЦР в реальном времени для изучения изменения экспрессии генов при нокауте *insrr*. Так же начата работа с изучением белковых изменений в почке при отсутствии рецепторной тирозинкиназы IRR [68]. Это является непростой задачей, так как тема малоизучена, даже полученные результаты не дают окончательных ответов на поставленные вопросы о механизме действия IRR в почке. Тем не менее, мышьяная модель для изучения изменений молекулярной физиологии в почке оказалась хорошим объектом.

Используя метод РНК-секвенирования осуществлен поиск и обнаружены гены, дифференциально экспрессируемые в почке в отсутствие IRR, а также почечные гены, регулируемые нагрузкой бикарбоната и зависящие от экспрессии IRR. После обогащения онтологии генов GO обнаружили, что отсутствие IRR приводит к изменениям в экспрессии генов, связанных с метаболическими процессами [65, 70]. Гены, участвующие в окислительном фосфорилировании и рибосомальных белках, существенно активируются после нокаута IRR (например, *ndufa1*, *mt-nd6*, *cox6b*, *atp6v1g3*), тогда как несколько генов мембранных транспортеров были скорее подавлены (например, *slc26a4*, *slc16a1*, *slc5a2*). Это указывает на то, что сигнализация IRR участвует в энергоснабжении клеток. В то время как в группе нокаута бикарбонатная нагрузка не вызвала существенного эффекта, согласно анализу fgsea, у мышей дикого типа она привела к изменению активности транспортеров, которая значительно выше в группе бикарбоната. Объяснение таких различных ответов на бикарбонатную нагрузку в группах нокаута и дикого типа заключается в том, что нокаут *insrr*, вероятно, сам по себе вызывает изменения, сопоставимые с изменениями, вызываемые бикарбонатной нагрузкой. Хотя хорошо известно, что IRR экспрессируется в β -вставочных клетках собирательного протока, были обнаружены изменения в экспрессии генов в отдаленных частях нефрона, включая проксимальный каналец. Поскольку большая часть реабсорбции бикарбоната происходит в проксимальных канальцах, изменение экспрессии генов в этих клетках может представлять собой адаптивный ответ на увеличение концентрации бикарбоната в крови животных с нокаутом *insrr*. Мы обнаружили изменения в экспрессии генов *kcnk5*, *slc6a6*, *slc5a2*, кодирующих мембранные транспортеры и каналы. Чен и др. предоставили базу данных <https://esbl.nhlbi.nih.gov/MRECA/Nephron/> [37], где мы локализовали гены, экспрессия которых, согласно нашим данным секвенирования, была снижена. Было несколько генов *plcd1*, *rps7* и *slc5a2*, которые снизили свою экспрессию после нокаута *insrr*, но ни один из них не локализовался в бета-вставочных клетках [36]. Для *plcd1* областью с наибольшей встречаемостью транскрипта является толстый восходящий отдел петли Генле, для *rps7* — нисходящий отдел петли Генле, а для *slc5a2* — проксимальный каналец. Таким образом, впервые мы показали изменение характера экспрессии гена не только в β -вставочных клетках, но и во всей почке. На мышинной модели нокаута TASK2, после обратного скрещивания с C57BL6 мыши *kcnk5*(-/-) показали повышенную перинатальную смертность, а во взрослом возрасте — снижение массы тела и артериального давления. При контрольных измерениях клиренса инулина у мышей наблюдалась нормальная экскреция NaCl и воды. Во время перфузии NaHCO₃ у животных снижалась почечная способность к реабсорбции Na⁺ и воды. У мышей *kcnk5*(-/-) pH крови, концентрация HCO₃⁻ в крови были снижены, а pH мочи и концентрация HCO₃⁻ в моче увеличены. Последствия инактивации гена *kcnk5* у мышей напоминают клинические проявления, наблюдаемые при синдроме проксимального почечного канальцевого ацидоза

человека [188]. TASK2 — это молекула, чувствительная к рН, которая активируется внеклеточным подщелачиванием и экспрессируется на базолатеральной стороне клеток проксимальных канальцев. Основными функциями TASK2 в почках являются реабсорбция бикарбоната и воды и регуляция объема клеток. Делеция TASK2 в почках вызывает потерю бикарбоната с мочой, что приводит к метаболическому ацидозу. У мышей TASK2 KO также наблюдается значительное снижение артериального давления по сравнению с мышами дикого типа. TASK2 функционально связан с котранспортером $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ NBCe1-A. Отток ионов Na^+ и HCO_3^- NBCe1-A приводит к деполяризации базолатеральной мембраны. Повышенная концентрация HCO_3^- во внеклеточном пространстве вызывает повышение рН, что активирует TASK2. Удаление NBCe1-A, а также TASK2 вызывает метаболический ацидоз [189]. Так как при нокауте IRR наблюдается пониженная экскреция бикарбоната, увеличение экспрессии калиевого канала *kcnk5* может быть связано с увеличением транспорта калия для поддержания необходимого уровня рН ультрафильтрата в почке. По полученным нами данным ПЦР в реальном времени при экспериментальном алкалозе в диком типе происходит увеличение экспрессии TASK-2, что указывает на участие этого белка в поддержании кислотно-щелочного баланса в организме.

В результате РНК-секвенирования и ПЦР в реальном времени показано достоверное снижение гена *gadh*. Ген *gadh*, который относится к генам «домашнего хозяйства», кодирует фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH). Эти гены являются конститутивными генами, которые необходимы для поддержания основных клеточных функций и стабильно экспрессируются во всех клетках организма при любых условиях и на всех стадиях развития [194]. Однако, ранее были показаны различия в уровнях экспрессии мРНК *gadh* между разными тканями. Ген *gadh* экспрессируется во всех органах, наибольшая количество мРНК обнаруживается в тканях с активным энергопотреблением, в скелетных и сердечной мышцах [121]. Уровень экспрессии мРНК GAPDH может меняться с возрастом и статусом питания, что было показано на модели цыплят на ранних сроках после вылупления [130]. Так же есть сведения, что уровень мРНК гена *gadh* примерно одинаков для тканей почки, печени и мозга [163]. В почке млекопитающих показано, что GAPDH связан с хлоридно-бикарбонатным обменником AE1 (*slc4a1*), который отвечает за реабсорбцию бикарбоната в α -вставочных клетках собирательной трубки. α -вставочные клетки почек отвечают за выведение избытка кислот из организма и реабсорбцию бикарбоната в кровь, участвуя таким образом в поддержании кислотно-основного гомеостаза. Для C-конца белка AE1 в почке характерно связывание с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой, которое обеспечивает его локализацию на мембране [175]. Исходя из этого, можно предположить участие GAPDH в регуляции кислотно-основного баланса в почке. Показано, что GAPDH участвует во многих событиях, которые связаны с общим процессом передачи сигналов инсулина, включая сигнальные пути белков PI3K, Akt, Rab [163]. Взаи-

модействие между GAPDH (т. е. фосфорилированной формой фермента) и фосфорилированным Akt в сердечной мышце крыс возникает при повышении глюкозы крови [15]. Рецепторы инсулинового семейства, в том числе и IRR так же задействуют сигнальные пути, связанные с PI3K и Akt белками. Снижение уровня экспрессии белка GAPDH может приводить к изменению уровня метаболизма у мышей, нокаутных по гену *insrr*, о чем свидетельствуют и наши предыдущие исследования [2]. GAPDH хорошо известен как один из ключевых ферментов, участвующих в гликолизе. Помимо своей роли в гликолизе GAPDH участвует во множестве внутриклеточных процессов, таких как апоптоз, транспорт железа, слияние мембран, регуляция транскрипции, транспорт везикул от эндоплазматического ретикулума к аппарату Гольджи, а также клеточная реакция на воздействия окружающей среды, например, при окислительном стрессе или гипоксии [168].

Ранее было показано, что у мышей, несущих нокаут *insrr* *-/-* наблюдаются поведенческие особенности в виде снижения агрессивно-оборонительного поведения [211], что может быть связано с изменением экспрессии ряда генов, в том числе *gapdh* в мозге нокаутных мышей. Вероятно, даже небольшое снижение экспрессии гена *gapdh* в органах мышцы может оказать влияние на метаболический статус таких органов, как мозг и печень.

Ген *gapdh* используется в качестве гена сравнения для ПЦР в реальном времени в большинстве современных исследований. Полученные в ходе наших экспериментов данные не позволяют использовать этот ген как референсный для анализа экспрессии генов мышей, нокаутных по *insrr*. Для животной модели, используемой в эксперименте, нами был выбран ген *Ap3d1* в качестве референсного. В данной работе показали снижение экспрессии гена *gapdh* в почках мышей, нокаутных по *insrr*, методами РНК-секвенирования, TaqMan ПЦР в реальном времени и Вестерн блоттинга, как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Методом TaqMan ПЦР в реальном времени выявили также снижение уровня экспрессии *gapdh* не только в почках, но и в печени и мозге мышей, нокаутных по *insrr*. Ранее нами было показано, что у мышей, нокаутных по гену *insrr*, при щелочной нагрузке на организм наблюдается пониженная секреция бикарбоната в мочу [46]. При этом нокаут гена *insrr* приводит к снижению экспрессии Cl⁻/HCO₃⁻ обменника SLC26A4, который локализуется β-вставочных клетках почечных канальцев, участвующих в секреции ионов бикарбоната почками. Таким образом изменение экспрессии гена *gapdh* в почках мышей, нокаутных по *insrr*, может свидетельствовать о функциональной взаимосвязи генов, и о возможной роли GAPDH в ранее не описанных молекулярных механизмах регуляции кислотно-основного баланса в организме.

В результате секвенирования изменение экспрессии показано не только для генов, но и для малых некодирующих РНК, так ранее показано значимое снижение *Rnu3*. Малые некодирующие РНК (ncRNA) представляют собой большое семейство эндогенно экспрессируемых

транскриптов длиной от 18 до 200 нуклеотидов, которые играют решающую роль в регуляции функции клеток. Два десятилетия назад их считали «мусорной» РНК неизвестной функции, однако сегодня считается, что малые ncRNA участвуют почти во всех онтогенетических и патологических процессах у млекопитающих. Хотя точная функция многих ncRNA остается неизвестной, многочисленные исследования выявили прямое участие различных малых ncRNA в регуляции экспрессии генов на уровнях посттранскрипционного процессинга мРНК, а так же в регуляции процессов, связанных с ДНК [95]. Так, например, некодирующие Y РНК недавно были идентифицированы как важные новые факторы репликации хромосомной ДНК в ядрах клеток млекопитающих. Деграция Y3 РНК ингибирует создание новых вилок репликации ДНК при переходе G1- в S-фазу, и во время S-фазы. В присутствие экзогенной РНК Y1, ингибирования не происходит. Скорость прогрессирования вилок репликации ДНК не зависит от РНК Y3 или РНК Y1. Эти данные указывают на то, что Y РНК необходимы для создания, но не для удлинения, вилок репликации хромосомной ДНК в ядрах клеток млекопитающих [101].

Среди генов со сниженной экспрессией присутствовал ген, кодирующий белок семейства Ly6/uPAR. Эти белки имеют общую структуру, их профили экспрессии и функции различаются. На сегодняшний день идентифицировано 35 человеческих и 61 мышинных Ly6/uPAR белков в этом суперсемействе [130]. Гены *Lynx* принадлежат к суперсемейству *ly-6 / uPAR*, которое принимает трехпетлевую складчатую структуру, называемую токсиновым фолдингом. Это приводит к трехпетлевой структуре, стабилизированной жесткими бета-листами, которые могут образовывать почти безграничный набор конформаций связывания рецепторов и / или каналов [131]. *LYPD2* (домен *LY6/PLAUR* категории 2), является паралогом *SLURP1*, представляет собой ген с неизвестной функцией, экспрессирующийся на высоких уровнях в нормальном эпителии дыхательных путей человека. Предполагается, что *SLURP1* является положительным модулятором никотинового рецептора $\alpha 7$, экспрессируемого на эпителии дыхательных путей, где он действует, защищая респираторный эпителий, подавляя ответы на воспалительные стимулы. Вероятно, что *LYPD2* может функционировать параллельным образом [132]. Ранее коллегами была показана связь рецептора *IRR* с другим членом семейства белков Ly6 – *lypd1* [165]. Известно, что белок *Ly6/PLAUR* способен стимулировать десенсибилизацию никотиновых ацетилхолиновых рецепторов. Эти результаты предполагают, что поведенческие характеристики мышей, лишенных *IRR*, вызваны функциональной связью между *IRR* и *Ly6/PLAUR* в холинергических нейронах мозга

Тауриновый транспортер *TAUT*, кодируемый геном *slc36b*, играет важную роль в поддержании кислотно-щелочного баланса в почке, так как влияет на осмоляльность мочи. При недостатке воды он представлен на апикальной мембране клеток собирательной трубки и его концентрация повышена, а при нормальном питье животных локализуется на базолатеральной

мембране в низкой концентрации [21]. Показана повышенная экспрессия гена *slc6ab*, кодирующего Na⁺- и Cl⁻-зависимый транспортер таурина (TauT). Основная роль транспорта таурина — осморегуляция, которая способствует регуляции объема клеток. У мышей с дефицитом транспортера таурина наблюдается нарушение энергетического обмена, о чем свидетельствует дисфункция дыхательной цепи в различных органах [17]. Повышенный уровень экспрессии *slc6ab* согласуется с общей повышенной регуляцией генов, участвующих в окислительном фосфорилировании у мышей с нокаутом *insrr*. Дополнительно TAUT, как и IRR, представлен в бета-клетках поджелудочной железы, где при введение таурина изменяется электрогенный ответ β-клеток, что приводит к изменению гомеостаза кальция и последующему снижению уровню внутриклеточного инсулина. Следствием этих действий может быть повышение уровня инсулина в плазме, приводящее к снижению уровня глюкозы в плазме крови [104]. Мыши с нокаутом TAUT (TAUT KO) демонстрировали меньшую массу тела и меньшую массу абдоминального жира, когда их поддерживали на нормальном корме, чем мыши дикого типа (WT). Удаление глюкозы из крови после внутрибрюшинной инъекции глюкозы было быстрее у мышей TAUT KO, чем у мышей WT, несмотря на более низкие уровни инсулина в сыворотке. Островковые бета-клетки поджелудочной железы (инсулин-положительная область) также были уменьшены у мышей TAUT KO по сравнению с мышами WT [96]. Значительные изменения тауринового транспортера в почке и его роль в бета-клетках поджелудочной железы могут позволить установить связь с рецепторной тирозинкиназой IRR, что позволяет предположить о наличии совместной экспрессии в определенных типах клеток, что связывает их функции.

Na⁺/глюкозный котранспортер 2 (SGLT2), кодируемый *slc5a2*, является основным транспортером глюкозы в почках. 90% глюкозы реабсорбируется в клетках проксимальных канальцев через SGLT2. И согласно набору данных РНК-секвенирования экспрессия Na⁺/глюкозного котранспортера 1 (SGLT1) остается неизменной. Поскольку *slc5a2* подавлен, мы провели внутрибрюшинный тест на толерантность к глюкозе. Мы обнаружили, что через 60 мин концентрация глюкозы в крови у нокаутных животных была выше, чем у мышей дикого типа, а AUC была значительно выше у нокаутированных мышей. Таким образом, мы показали различную регуляцию концентрации глюкозы у однопометных мышей с нокаутированным *insrr* по сравнению с мышами дикого типа. Мы считаем, что подавление гена *slc5a2* является компенсаторной реакцией на повышенный уровень глюкозы в крови при определенных условиях у мышей с инактивированным *insrr*. Вероятно, это связано с неравномерным внутриклеточным распределением этого мембранного белка. Несмотря на общее снижение этого белка у нокаутных животных, отношение мембранной и цитоплазматической форм не изменяется при нокауте, что компенсирует низкий уровень экспрессии гена *slc5a2*, либо отношение может измениться, на мембране одинаково, а внутри клетки меньше. В работе [186] показана локализация

SGLT2 в цитоплазме в значительном количестве на срезах почки, что может объяснить различия, полученные нами ранее.

Традиционно считалось, что β -вставочные клетки участвуют исключительно в секреции оснований, α -вставочные клетки участвуют в секреции кислот, в то время как основные клетки (principal cells) собирательной трубки нефрона реабсорбируют натрий и воду и секретируют калий. В β -вставочных клетках апикальный приток Cl^- , который происходит через $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ – обменник пендрин, связан с апикальным притоком Na^+ через Na^+ -управляемый $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменник NDCBE [78]. α -вставочные клетки мышинных собирательных трубок обладают способностью секретировать Na^+ и Cl^- через $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ котранспортер NKCC1, вероятно, Na^+/K^+ обменник NKA2, и не идентифицированный Cl^- канал [129]. Кроме того, недавние исследования показывают, что основные клетки участвуют в контроле кислотно-щелочного гомеостаза [40]. Множественные транспортные активности в различных типах клеток хорошо скоординированы, что предполагает тесную связь между этими клетками. Продемонстрировано паракринное перекрестное взаимодействие между β -вставочными клетками и основными клетками посредством АТФ-запускаемого высвобождения простагландина E2. Благодаря этому механизму β -IC могут подавлять ENaC в соседних PC, таким образом участвуя в регуляции баланса натрия и, следовательно, внеклеточного объема и артериального давления [78].

Таким образом, в ходе исследования фенотипа IRR-нокаутных мышей было установлено, что у животных с инактивированным геном IRR при индукции алкалоза наблюдалось значительное повышение концентрации бикарбоната в крови по сравнению с мышами дикого типа. При этом уровень pH крови существенно не отличался. В контрольных условиях различий по этим показателям между группами не выявлено.

В условиях бикарбонатной нагрузки у IRR-нокаутных мышей отмечено снижение секреции бикарбоната в мочу и, как следствие, более низкий pH мочи. После введения бикарбоната концентрация последнего в крови нокаутных мышей оказалась значительно выше, чем у мышей дикого типа. Дополнительно выявлено, что при длительной нагрузке экспрессия ключевых транспортных белков (пендрина и протонного насоса Atp6V) в почках у нокаутных мышей снижена на 40–50%, что указывает на важную роль рецептора IRR в регуляции почечной секреции бикарбоната и поддержании кислотно-щелочного баланса организма [52, 69, 70].

Для выяснения влияния роли рецептора IRR на развитие преимплантационных эмбрионов, выбрали MEA-тест (mouse embryo assay), так как ранее подобные эксперименты не проводились. Тест оценивает количественное развитие эмбрионов, параметром для оценки является количество образовавшихся бластоцист, а также их качество. Мыши с инактивацией IRR демонстрируют меньшее количество нормально развивающихся преимплантационных эмбрионов, что указывает на участие рецепторной тирозинкиназы IRR в развитии мышинных эмбрио-

нов. Ионный состав и рН жидкой среды в половых путях самок имеет большое физиологическое значение для ряда репродуктивных событий, включая транспорт спермы, оплодотворение, транспорт эмбрионов, развитие и имплантацию бластоцист [116]. Известно, что маточные жидкости содержат в два-четыре раза больше ионов бикарбоната, чем плазма крови. При этом во время эструса значение рН маточной жидкости достигает значения больше 8 (щелочная среда), в то время как при диэструсе значение рН среды понижается и становится близким к нейтральному [87]. Поддержание кислотно-щелочного баланса в клетках преимплантационных эмбрионов также играет важную роль. Так, например, была показана высокая экспрессия Cl⁻/HCO₃⁻-обменников SLC4A2, SLC4A4 на стадиях преимплантационного эмбрионального развития мышей. Данные обменники регулируют внутриклеточный рН, обеспечивая механизм защиты клеток от алкалоза. Активность Cl⁻/HCO₃⁻-обменников снижается в ходе развития, активность на стадиях морулы и бластоцисты значительно ниже по сравнению с одно- и двух клеточной стадиями. Таким образом преимплантационные эмбрионы адаптируются к окружающей среде при переходе от щелочной среды яйцевода в среду матки с более низкими значениями рН [43].

Ранее нами было показано, что нокаут гена *insrr* приводит к снижению экспрессии Cl⁻/HCO₃⁻-обменника SLC26A4. Ионнообменник пендрин (SLC26A) локализуется в β -вставочных клетках почечных канальцев, которые участвуют в экскреции ионов бикарбоната почками. Можно предположить, что рН-чувствительный рецептор IRR, активируясь в ответ на повышение рН внеклеточной среды, может запускать сигнальные каскады в клетке, которые приводят к изменению экспрессии и/или активности ионных каналов, непосредственно участвующих в регуляции концентрации кислот и оснований, в частности ионов HCO₃⁻. Ионы HCO₃⁻, как известно, играют критически важную роль в процессах, связанных с размножением у млекопитающих, при этом нарушение кислотно-основного гомеостаза в репродуктивной системе часто вызывает бесплодие/субфертильность у млекопитающих [116].

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 было 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 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 груп-

пах 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 нокаутом *insrr* выявил глубокие различия в фундаментальных процессах в клетке, таких как энергетический обмен и синтез белка, что 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-Ndb*, *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 – пендрин *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 *atpbv1g3*, 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 литературы

1. Деев И. Е. [и др.]. Недостаточный ответ на метаболический алкалоз в мышцах нокаутных по гену *insrr* 2009. С. 65–67.
2. Деев И. Е. [и др.]. Декомпенсированный метаболический алкалоз у мышцей с нокаутом гена *insrr* 2011. № 11 (4). С. 119–122.
3. Деев И. Е. [и др.]. Новые механизмы активации семейства рецепторов инсулина // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2023. № 11s (86). С. 47.
4. Попова Н. В., Деев И. Е., Петренко А. Г. Анализ Структурных Детерминант Положительной Кооперативности Щелочного Сенсора *Irr* // Доклады Академии Наук. 2013. № 5 (450). С. 602–605.
5. Серова О. В. [и др.]. Значение Рн-Сенсоров В Поддержании Гомеостаза Нервной Системы // Биоорганическая Химия. 2020. № 4 (46). С. 369–384.
6. Agre P. [и др.]. Aquaporin water channels - From atomic structure to clinical medicine // Journal of Physiology. 2002. № 1 (542). С. 3–16.
7. Al-Azzam N. [и др.]. Acid-base imbalance as a risk factor for mortality among COVID-19 hospitalized patients // Bioscience Reports. 2023. С. 20222362.
8. Alexander R. T., Bockenhauer D. Renal Tubular Acidosis // Pediatric Kidney Disease. 2023. С. 1071–1093.
9. Alfano G. [и др.]. Acid base disorders in patients with COVID-19 // International Urology and Nephrology. 2022. № 2 (54). С. 405.
10. Ali K. F. Estimation and evaluation of the effect of pH on ciprofloxacin in drug formulations // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2014. № 4 (6). С. 910–916.
11. Alva S. M. [и др.]. A Study on Effect of Bicarbonate Supplementation on the Progression of Chronic Kidney Disease // Indian journal of nephrology. 2020. № 2 (30). С. 91–97.
12. Amlal H. [и др.]. Downregulation of renal AQP2 water channel and NKCC2 in mice lacking the apical $\text{Na}^{+}\text{-H}^{+}$ exchanger NHE3 // Journal of Physiology. 2003. № 2 (553). С. 511–522.
13. Auer R. N. Hypoglycemic brain damage // Forensic Science International. 2004. № 2–3 (146). С. 105–110.
14. Azagra M. [и др.]. Ammonium quantification in human plasma by proton nuclear magnetic resonance for staging of liver fibrosis in alcohol-related liver disease and nonalcoholic fatty liver disease // NMR in Biomedicine. 2022. № 9 (35). С. e4745.
15. Baba T. [и др.]. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with phosphorylated Akt resulting from increased blood glucose in rat cardiac muscle // FEBS Letters. 2010. № 13 (584). С. 2796–2800.

16. Bakris G. L. [и др.]. Renal sodium–glucose transport: role in diabetes mellitus and potential clinical implications // *Kidney International*. 2009. № 12 (75). С. 1272–1277.
17. Baliou S. [и др.]. Significance of taurine transporter (TauT) in homeostasis and its layers of regulation (review) // *Molecular Medicine Reports*. 2020. № 3 (22). С. 2163–2173.
18. Barré-Sinoussi F., Montagutelli X. Animal models are essential to biological research: Issues and perspectives // *Future Science OA*. 2015. № 4 (1). С. 0–5.
19. Barrett T. [и др.]. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update.
20. Bates C. M. [и др.]. Insulin receptor-related receptor expression in non-A intercalated cells in the kidney // *Kidney International*. 1997. № 3 (52). С. 674–681.
21. Bedford J. J. [и др.]. Upregulation of the taurine transporter, TAUT, in the renal medulla of thirsted rats // *The FASEB Journal*. 2006. № 5 (20). С. A1221–A1221.
22. Bellocq A. [и др.]. Low environmental pH is responsible for the induction of nitric-oxide synthase in macrophages: Evidence for involvement of nuclear factor- κ b activation // *Journal of Biological Chemistry*. 1998. № 9 (273). С. 5086–5092.
23. Berrout J. [и др.]. Emerging Role of the Calcium-Activated, Small Conductance, SK3 K⁺ Channel in Distal Tubule Function: Regulation by TRPV4 // *PLOS ONE*. 2014. № 4 (9). С. e95149.
24. Blanchard A. [и др.]. NH₄⁺ as a substrate for apical and basolateral Na⁺-H⁺ exchangers of thick ascending limbs of rat kidney: evidence from isolated membranes // *The Journal of Physiology*. 1998. № 3 (506). С. 689–698.
25. Bobulescu I. A. [и др.]. Glucocorticoids acutely increase cell surface Na⁺/H⁺ exchanger-3 (NHE3) by activation of NHE3 exocytosis // <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00447.2004>. 2005. № 4 58-4 (289). С. 685–691.
26. Boron W. F. Acid-Base Transport by the Renal Proximal Tubule // *Lecture J Am Soc Nephrol*. 2006. (17). С. 2368–2382.
27. Brown D., Wagner C. A. Molecular mechanisms of acid-base sensing by the kidney // *Journal of the American Society of Nephrology*. 2012. № 5 (23). С. 774–780.
28. Brusentsev E. Yu. [и др.]. Effects of Insulin-Like Growth Factor 1 on the In Vitro Development of Mouse Embryos after Cryopreservation // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2021. № 2 (52).
29. Bunder F. A. I. M. van den [и др.]. Respiratory problems owing to severe metabolic alkalosis in infants presenting with hypertrophic pyloric stenosis // *Journal of Pediatric Surgery*. 2020. № 12 (55). С. 2772–2776.
30. Capasso G. [и др.]. Bicarbonate Transport Along the Loop of Henle II. Effects of Acid-Base, Dietary, and Neurohumoral Determinants Key words: loop of Henle * high sodium diet * angiotensin II * DuP 753 * renal denervation.

31. Capasso G. [и др.]. Bicarbonate Transport Along the Loop of Henle 1. Microperfusion Studies of Load and Inhibitor Sensitivity Key words: loop of Henle * bicarbonate transport * amiloride * bafilomycin-di-isothiocyanato-2,2'-stilbenedisulfonate // *J. Clin. Invest.* 1991. (88). С. 430–437.
32. Carbon S. [и др.]. The Gene Ontology resource: enriching a GOLD mine // *Nucleic Acids Research.* 2021. № D1 (49). С. D325–D334.
33. Cheema-Dhadli S., Lin S.-H., Halperin M. L. Mechanisms used to dispose of progressively increasing alkali load in rats // <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00006.2001>. 2002. № 6 51-6 (282).
34. Chen H. [и др.]. SGLT2 Inhibition by Dapagliflozin Attenuates Diabetic Ketoacidosis in Mice with Type-1 Diabetes // *Cardiovascular Drugs and Therapy.* 2022. № 6 (36). С. 1091–1108.
35. Chen L. [и др.]. *Development and Diseases of the Collecting Duct System* 2017.
36. Chen L. [и др.]. Transcriptomes of major renal collecting duct cell types in mouse identified by single-cell RNA-seq // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2017. № 46 (114). С. E9989–E9998.
37. Chen L., Chou C. L., Knepper M. A. A Comprehensive Map of mRNAs and Their Isoforms across All 14 Renal Tubule Segments of Mouse // *Journal of the American Society of Nephrology.* 2021. № 4 (32). С. 897–912.
38. Chen S. [и др.]. Macrophages in immunoregulation and therapeutics // *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023 8:1. 2023. № 1 (8). С. 1–35.
39. Chen S. [и др.]. Macrophages in immunoregulation and therapeutics.
40. Cheval L. [и др.]. Acidosis-induced activation of distal nephron principal cells triggers Gdf15 secretion and adaptive proliferation of intercalated cells // *Acta Physiologica.* 2021. № 3 (232). С. e13661.
41. Clayton-smith M. Renal physiology : acid e base balance // *Anaesthesia and Intensive Care Medicine.* 2021. № 7 (22). С. 415–421.
42. Clerk A., Sugden P. H. The insulin receptor family in the heart: New light on old insights // *Bioscience Reports.* 2022. № 7 (42). С. 20221212.
43. Dağılğan S. [и др.]. Evaluation of intracellular pH regulation and alkalosis defense mechanisms in preimplantation embryos A new biosensor for fetal RHD detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma View project Evaluation of the CYP polymorphisms in psychiatry patients View project Evaluation of intracellular pH regulation and alkalosis defense mechanisms in preimplantation embryos 2017.
44. Deev I. E. [и др.]. Effect of changes in ambient pH on phosphorylation of cellular proteins // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2006. № 1 (408). С. 184–187.
45. Deinhardt K., Chao M. V. Trk receptors // *Handbook of Experimental Pharmacology.* 2014. (220). С. 103–119.

46. Deyev I. E. [и др.]. Insulin receptor-related receptor as an extracellular alkali sensor // *Cell Metabolism*. 2011. № 6 (13). С. 679–689.
47. Deyev I. E. [и др.]. Insulin receptor-related receptor as an extracellular alkali sensor // *Cell Metabolism*. 2011. № 6 (13). С. 679–689.
48. Deyev I. E. [и др.]. Structural determinants of the insulin receptor-related receptor activation by Alkali // *Journal of Biological Chemistry*. 2013. № 47 (288). С. 33884–33893.
49. Deyev I. E. [и др.]. Mapping of alkali-sensing sites of the insulin receptor-related receptor. the role of L2 and fibronectin domains // *Biochimie*. 2015. (111). С. 1–9.
50. Deyev I. E. [и др.]. Alkaline pH induces IRR-mediated phosphorylation of IRS-1 and actin cytoskeleton remodeling in a pancreatic beta cell line // *Biochimie*. 2017. (138). С. 62–69.
51. Deyev I. E. [и др.]. Alkaline pH induces IRR-mediated phosphorylation of IRS-1 and actin cytoskeleton remodeling in a pancreatic beta cell line // *Biochimie*. 2017. (138). С. 62–69.
52. Deyev I. E. [и др.]. Profile of Gene Expression in the Kidneys of Mice with the insrr Gene Knock-out // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2018. № 2 (44). С. 256–260.
53. Deyev I. E. [и др.]. Supplemental Information Insulin Receptor-Related Receptor as an Extracellular Alkali Sensor.
54. Deyev IE [и др.]. Deficient response to experimentally induced alkalosis in mice with the inactivated insrr gene // *Acta Naturae* (англоязычная версия). 2011. № 4 (11) (3). С. 2011.
55. Diez-Roux G. [и др.]. A High-Resolution Anatomical Atlas of the Transcriptome in the Mouse Embryo // *PLOS Biology*. 2011. № 1 (9). С. e1000582.
56. Dobin A. [и др.]. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner // *Bioinformatics*. 2013. № 1 (29). С. 15–21.
57. Du L. [и др.]. Understanding the Functional Expression of Na⁺-Coupled SLC4 Transporters in the Renal and Nervous Systems: A Review // *Brain Sciences* 2021, Vol. 11, Page 1276. 2021. № 10 (11). С. 1276.
58. Du Z., Lovly C. M. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer // *Molecular Cancer*. 2018. № 1 (17). С. 1–13.
59. Dubey A. K. [и др.]. Correction of metabolic acidosis improves muscle mass and renal function in chronic kidney disease stages 3 and 4: a randomized controlled trial // *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2020. № 1 (35). С. 121–129.
60. Eaton A. F., Merkulova M., Brown D. The H⁺-ATPase (V-ATPase): From proton pump to signaling complex in health and disease // *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2021. № 3 (320). С. C392–C414.

61. Eladari D. [и др.]. Functional and molecular characterization of luminal and basolateral Cl⁻/ HCO³⁻ exchangers of rat thick limbs // <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1998.275.3.F334>. 1998. № 3 44-3 (275).
62. Erickson R. P., Strnatka D. Insulin receptor-related (Irr) is expressed in pre-implantation embryos: A possible relationship to “growth factor Y” and sex determination // *Molecular Reproduction and Development*. 2011. № 8 (78). С. 552–552.
63. Eshbach M. L., Weisz O. A. Receptor-Mediated Endocytosis in the Proximal Tubule // <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034234>. 2017. (79). С. 425–448.
64. Frankish A. [и др.]. GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes // *Nucleic Acids Research*. 2019. № D1 (47). С. D766–D773.
65. Gantsova E. [и др.]. Mechanisms and physiological relevance of acid-base exchange in functional units of the kidney // *PeerJ*. 2024. (12). С. e17316.
66. Gantsova E. A. [и др.]. GENES OF PH-SENSITIVITY ACTIVATED IN THE KIDNEYS OF INSRR KNOCKOUT MICE UNDER ALKALOSIS // *Genes & Cells*. 2020. № S3 (15). С. 130–131.
67. Gantsova E. A. [и др.]. Analysis of the Development of Insrr Knockout Mouse Preimplantation Embryos // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2022. № 3 (53). С. 192–197.
68. Gantsova E. A. [и др.]. Changes in the Expression of the gapdh Gene in the Organs of insrr Knockout Mice Springer, 2022.С. 113–118.
69. Gantsova E. A. [и др.]. Changes in the Expression of the gapdh Gene in the Organs of insrr Knockout Mice // *Doklady biological sciences : proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological sciences sections*. 2022. № 1 (505). С. 113–118.
70. Gantsova E. A. [и др.]. A Comparative Kidney Transcriptome Analysis of Bicarbonate-Loaded insrr-Null Mice // *Current Issues in Molecular Biology*. 2023. № 12 (45). С. 9709–9722.
71. Gantsova E. A. [и др.]. Морфологические особенности почек у мышей с нокаутом гена INSRR в условиях бикарбонатной нагрузки // *Морфология*. 2025.
72. Gantsova E. A. [и др.]. Морфологические особенности почек у мышей с нокаутом гена INSRR в условиях бикарбонатной нагрузки // *Морфология*. 2025.
73. Genini A. [и др.]. Adaptive response of the murine collecting duct to alkali loading // *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. 2020. № 8 (472). С. 1079–1092.
74. Gerry A. B., Leake D. S. Effect of low extracellular pH on NF-κB activation in macrophages // *Atherosclerosis*. 2014. № 2 (233). С. 537–544.
75. Gosmanov A. R., Gosmanova E. O., Dillard-Cannon E. Management of adult diabetic ketoacidosis // *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2014. (7). С. 255.
76. Gouveia V. M. [и др.]. Macrophage Targeting pH Responsive Polymersomes for Glucocorticoid Therapy // *Pharmaceutics* 2019, Vol. 11, Page 614. 2019. № 11 (11). С. 614.

77. Greger R. Ion Transport Mechanisms in Thick Ascending Limb of Henle's Loop of Mammalian Nephron // *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*. 1985. № 3 (65).
78. Gueutin V. [и др.]. Renal β -intercalated cells maintain body fluid and electrolyte balance // *The Journal of Clinical Investigation*. 2013. № 10 (123). С. 4219.
79. Gulsvik R. [и др.]. Acetazolamide improves oxygenation in patients with respiratory failure and metabolic alkalosis // *The Clinical Respiratory Journal*. 2013. № 4 (7). С. 390–396.
80. Gupta P. [и др.]. Ultrasonographic predictors in chronic kidney disease: A hospital based case control study // *Journal of Clinical Ultrasound*. 2021. № 7 (49). С. 715–719.
81. Halperin M. L. How much “new” bicarbonate is formed in the distal nephron in the process of net acid excretion? // *Kidney International*. 1989. № 6 (35). С. 1277–1281.
82. Halperin M. L., Cheema Dhadli S., Kamel K. S. Physiology of Acid-Base Balance: Links With Kidney Stone Prevention // *Seminars in Nephrology*. 2006. № 6 (26). С. 441–446.
83. Hamm L. L., Nakhoul N., Hering-Smith K. S. Acid-Base Homeostasis // *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2015. № 12 (10). С. 2232–2242.
84. Han X. [и др.]. The taurine transporter: Mechanisms of regulation // *Acta Physiologica*. 2006. № 1–2 (187). С. 61–73.
85. Hangs B. S. K., Quinn A. M. [2] Protein Kinase Catalytic Domain Sequence Database: Identification of Conserved Features of Primary Structure and Classification of Family Members 1991. № 1987 (200). С. 38–62.
86. Harris A. N. [и др.]. An Update on Kidney Ammonium Transport Along the Nephron // *Advances in Kidney Disease and Health*. 2023. № 2 (30). С. 189–196.
87. He Q. [и др.]. Regulatory mechanism underlying cyclic changes in mouse uterine bicarbonate secretion: role of estrogen // *Reproduction*. 2010. № 6 (140). С. 903–910.
88. Hennings J. C. [и др.]. The ClC-K2 Chloride Channel Is Critical for Salt Handling in the Distal Nephron // *J Am Soc Nephrol*. 2017. (28). С. 209–217.
89. Hildyard J. C. W., Finch A. M., Wells D. J. Identification of qPCR reference genes suitable for normalizing gene expression in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy // *PLoS ONE*. 2019. № 1 (14).
90. Holmdahl R., Malissen B. The need for littermate controls // *European Journal of Immunology*. 2012. № 1 (42). С. 45–47.
91. Houillier P., Bourgeois S. More actors in ammonia absorption by the thick ascending limb // *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012. (302). С. 293–297.
92. Howles S. A., Thakker R. V. Genetics of kidney stone disease // *Nature Reviews Urology*. 2020. № 7 (17). С. 407–421.

93. Imenez Silva P. H., Mohebbi N. Kidney metabolism and acid–base control: back to the basics // *Pflugers Archiv*. 2022. № 8 (474). С. 919.
94. Iorio B. R. Di [и др.]. Treatment of metabolic acidosis with sodium bicarbonate delays progression of chronic kidney disease: the UBI Study // *Journal of nephrology*. 2019. № 6 (32). С. 989–1001.
95. Isakova A. [и др.]. A mouse tissue atlas of small noncoding RNA.
96. Ito T. [и др.]. Impact of taurine depletion on glucose control and insulin secretion in mice // *Journal of Pharmacological Sciences*. 2015. № 1 (129). С. 59–64.
97. Jiang Z. Metabolic alkalosis and mortality in COVID-19 // *medRxiv*. 2022. С. 2022.04.01.22273291.
98. Kitamura T. [и др.]. Preserved Pancreatic β -Cell Development and Function in Mice Lacking the Insulin Receptor-Related Receptor // *Molecular and Cellular Biology*. 2001. № 16 (21). С. 5624.
99. Korotkevich G. [и др.]. Fast gene set enrichment analysis // *bioRxiv*. 2021. С. 060012.
100. Kriz W., Kaissling B. Structural Organization of the Mammalian Kidney / W. Kriz, B. Kaissling, 2008. 479–563 с.
101. Krude T. [и др.]. Y RNA functions at the initiation step of mammalian chromosomal DNA replication // *Journal of Cell Science*. 2009. № 16 (122). С. 2836–2845.
102. Kunzelmann K. [и др.]. Pathogenic Relationships in Cystic Fibrosis and Renal Diseases: CFTR, SLC26A9 and Anoctamins // *International journal of molecular sciences*. 2023. № 17 (24).
103. Kurtzman N. A. Regulation of Renal Bicarbonate Reabsorption by Extracellular Volume.
104. L'Amoreaux W. J. [и др.]. Taurine regulates insulin release from pancreatic beta cell lines // *Journal of Biomedical Science* 2010 17:1. 2010. № 1 (17). С. 1–8.
105. Langfelder P., Horvath S. WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis // *BMC Bioinformatics*. 2008. № 1 (9). С. 1–13.
106. Lea J. P. [и др.]. Immunolocalization of phospholipase C isoforms in rat kidney // *Kidney International*. 1998. № 5 (54). С. 1484–1490.
107. Ledoussal C. [и др.]. Renal salt wasting in mice lacking NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger but not in mice lacking NHE2 // <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.281.4.F718>. 2001. № 4 50-4 (281).
108. Lee H. W. [и др.]. Effect of collecting duct-specific deletion of both Rh B glycoprotein (Rhbg) and Rh C glycoprotein (Rhcg) on renal response to metabolic acidosis // *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2014. № 4 (306). С. 389–400.
109. Lemmon M. A., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases // *Cell*. 2010. № 7 (141). С. 1117–1134.
110. Leviel F. [и др.]. The Na⁺-dependent chloride-bicarbonate exchanger SLC4A8 mediates an electroneutral Na⁺ reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice // *The Journal of Clinical Investigation*. 2010. № 5 (120). С. 1627–1635.

111. Li H. J. [и др.]. Distinct Cellular Origins for Serotonin-Expressing and Enterochromaffin-Like Cells in the Gastric Corpus // *Gastroenterology*. 2013. № 3 (146). С. 754.
112. Li J. [и др.]. SLC26 family: a new insight for kidney stone disease // *Frontiers in Physiology*. 2023. (14). С. 1118342.
113. Lippi G., South A. M., Henry B. M. Electrolyte imbalances in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) // *Annals of Clinical Biochemistry*. 2020. № 3 (57). С. 262–265.
114. Lipsick J. A history of cancer research: Tyrosine kinases // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2019. № 2 (11). С. 1–20.
115. Liu C., Wang X. Clinical utility of ultrasonographic evaluation in acute kidney injury // *Translational Andrology and Urology*. 2020. № 3 (9). С. 1345355–1341355.
116. Liu Y., Wang D. K., Chen L. M. The physiology of bicarbonate transporters in mammalian reproduction // *Biology of Reproduction*. 2012. № 4 (86). С. 99–100.
117. Lorenz J. N. [и др.]. Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a model for type II Bartter's syndrome // *Journal of Biological Chemistry*. 2002. № 40 (277). С. 37871–37880.
118. Lu Y.-P. [и др.]. SGLT2 inhibitors improve kidney function and morphology by regulating renal metabolic reprogramming in mice with diabetic kidney disease // *Journal of Translational Medicine*. 2022. (20). С. 420.
119. Ma L., Merenmies J., Parada L. F. Molecular characterization of the TrkA/NGF receptor minimal enhancer reveals regulation by multiple cis elements to drive embryonic neuron expression // *Development*. 2000. № 17 (127). С. 3777–3788.
120. Ma T. [и др.]. Defective Secretion of Saliva in Transgenic Mice Lacking Aquaporin-5 Water Channels // *Journal of Biological Chemistry*. 1999. № 29 (274). С. 20071–20074.
121. Makrides V., Camargo S. M. R., Verrey F. Transport of amino acids in the kidney // *Comprehensive Physiology*. 2014. № 1 (4). С. 367–403.
122. Mannon E. C., O'Connor P. M. Alkali supplementation as a therapeutic in chronic kidney disease: What mediates protection? // *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2020. № 6 (319). С. F1090–F1104.
123. Mansouri N. [и др.]. Investigating the relationship between arterial blood gases, acid-base disorders, and outcomes in patients with covid-19 2022.
124. McCarthy D. J., Chen Y., Smyth G. K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation // *Nucleic Acids Research*. 2012. № 10 (40). С. 4288–4297.

125. McConnell E., ... A. B.-J. of P. and, 2008 undefined Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments // Wiley Online Library. 2010. № 1 (60). C. 63–70.
126. Meneton P., Loffing J., Warnock D. G. Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule // <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00454.2003>. 2004. № 4 56-4 (287).
127. Miyoshi T. [и др.]. Kidney organoids in translational medicine: Disease modeling and regenerative medicine // *Developmental Dynamics*. 2020. № 1 (249). C. 34–45.
128. Moffett B. S., Moffett T. I., Dickerson H. A. Acetazolamide therapy for hypochloremic metabolic alkalosis in pediatric patients with heart disease // *American journal of therapeutics*. 2007. № 4 (14). C. 331–335.
129. Morla L. [и др.]. The renal cortical collecting duct: a secreting epithelium? // *The Journal of Physiology C* 2016 The Authors. *The Journal of Physiology C*. 2016. (594). C. 20.
130. Mozdziak P. E., Dibner J. J., McCoy D. W. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Expression Varies With Age and Nutrition Status // *Nutrition*. 2003. № 5 (19). C. 438–440.
131. Mumtaz R. [и др.]. Intercalated Cell Depletion and Vacuolar H⁺-ATPase Mistargeting in an Ael R607H Knockin Model // *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2017. № 5 (28). C. 1507–1520.
132. Nagami G. T. Ammonia Production and Secretion by the Proximal Tubule 1989.
133. Nauck M. A. Update on developments with SGLT2 inhibitors in the management of type 2 diabetes // *Drug Design, Development and Therapy*. 2014. (8). C. 1335–1351.
134. Nef S. [и др.]. Testis determination requires insulin receptor family function in mice // *Nature*. 2003. № 6964 (426). C. 291–295.
135. Nef S. [и др.]. Testis determination requires insulin receptor family function in mice // *Nature*. 2003. № 6964 (426). C. 291–295.
136. Nezafati N., Moztarzadeh F., Hesaraki S. Surface Reactivity and in vitro Biological Evaluation of Sol Gel Derived Silver/calcium Silicophosphate Bioactive Glass // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2012. (17). C. 746–754.
137. Olesen E. T. B., Fenton R. A. Aquaporin 2 regulation: implications for water balance and polycystic kidney diseases // *Nature Reviews Nephrology* 2021 17:11. 2021. № 11 (17). C. 765–781.
138. Ozaki K. [и др.]. Localization of insulin receptor-related receptor in the rat kidney // *Kidney International*. 1997. № 3 (52). C. 694–698.
139. Pain R. W., \c\lary S. : BODY FLUID COMPARTMENTS // *Anaesth. Intens. Care*. 1977. (5). C. 284.

140. Pallone T. L., Zhang Z., Rhinehart K. Physiology of the renal medullary microcirculation // <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00304.2002>. 2003. № 2 53-2 (284).
141. Pan P. K. [и др.]. Acid external and internal environment exchange the *Oreochromis niloticus* tissue immune gene expression compared to the mouse macrophage polarization model // *Frontiers in Immunology*. 2022. (13).
142. Paragas N. [и др.]. α -Intercalated cells defend the urinary system from bacterial infection // *Journal of Clinical Investigation*. 2014. № 7 (124). С. 2963–2976.
143. Patro R. [и др.]. Salmon: fast and bias-aware quantification of transcript expression using dual-phase inference // *Nature methods*. 2017. № 4 (14). С. 417.
144. Peng C. [и др.]. Insrr Regulates IFN- β through Regulation of Actin Cytoskeleton Pathway in Rat Hepatocellular Carcinoma 2023.
145. Percie Du Sert N. [и др.]. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research // *BMC Veterinary Research*. 2020. № 1 (16). С. 1–7.
146. Petrenko A. G. [и др.]. Insulin receptor-related receptor as an extracellular pH sensor involved in the regulation of acid-base balance // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2013. T. 1834. № 10. С. 2170–2175.
147. Petrenko A. G. [и др.]. Insulin receptor-related receptor as an extracellular pH sensor involved in the regulation of acid-base balance // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2013. № 10 (1834). С. 2170–2175.
148. Petrenko A. G. [и др.]. Insulin receptor-related receptor as an extracellular pH sensor involved in the regulation of acid–base balance // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2013. № 10 (1834). С. 2170–2175.
149. Pfaffl M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Research*. 2001. № 9 (29). С. 0.
150. Pitts R. F. [и др.]. BICARBONATE AND THE RENAL REGULATION OF ACID BASE BALANCE¹ With the technical assistance of 1946.
151. Promeneur D. [и др.]. Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajprenal. 2000.
152. Raile K. [и др.]. Glucose concentration and AMP-dependent kinase activation regulate expression of insulin receptor family members in rat islets and INS-1E beta cells // *Diabetologia*. 2005. № 9 (48). С. 1798–1809.
153. Reinhardt R. R. [и др.]. Insulin receptor-related receptor messenger ribonucleic acid is focally expressed in sympathetic and sensory neurons and renal distal tubule cells. // *Endocrinology*. 1993. № 1 (133). С. 3–10.
154. Reinhardt R. R. [и др.]. Selective Coexpression of Insulin Receptor-related Receptor (IRR) and TRK in NGF-Sensitive Neurons // *The Journal of Neuroscience*. 1994. № 8 (14). С. 4874–4883.

155. Robertson S. C., Tynan J. A., Donoghue D. J. RTK mutations and human syndromes - When good receptors turn bad // *Trends in Genetics*. 2000. № 6 (16). С. 265–271.
156. Robey I. F., Martin N. K. Bicarbonate and dichloroacetate: evaluating pH altering therapies in a mouse model for metastatic breast cancer // *Springer*. 2011. (11).
157. Robinson D. R., Wu Y. M., Lin S. F. The protein tyrosine kinase family of the human genome // *Oncogene*. 2000. № 49 (19). С. 5548–5557.
158. Robinson M. D., McCarthy D. J., Smyth G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data // *Bioinformatics*. 2010. № 1 (26). С. 139–140.
159. Romero M. F. [и др.]. The SLC4 family of bicarbonate (HCO₃⁻) transporters // *Molecular Aspects of Medicine*. 2013. № 2–3 (34). С. 159–182.
160. Rosse C. [и др.]. PKC and the control of localized signal dynamics // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010. № 2 (11). С. 103–112.
161. Roy A., Al-Bataineh M. M., Pastor-Soler N. M. Collecting duct intercalated cell function and regulation // *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2015. № 2 (10). С. 305–324.
162. Schoeller D. A. [и др.]. Total body water measurement in humans with 18O and 2H labeled water // *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1980. (33). С. 2686–2693.
163. Seidler N. W. Basic biology of GAPDH // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013. (985). С. 1–36.
164. Seifter J. L., Chang H.-Y. Extracellular Acid-Base Balance and Ion Transport Between Body Fluid Compartments Acid-Base Balance Within Body Fluid Compartments 2017.
165. Shayahmetova D. M. [и др.]. Genetic link between IRR-receptor and Ly6/PLAUR protein // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2016. № 4 (42). С. 449–452.
166. Sheikh-Ali M. [и др.]. Can Serum β -Hydroxybutyrate Be Used to Diagnose Diabetic Ketoacidosis? // *Diabetes Care*. 2008. № 4 (31). С. 643–647.
167. Sierra C. M., Hernandez E. A., Parbuoni K. A. Use of Arginine Hydrochloride in the Treatment of Metabolic Alkalosis or Hypochloremia in Pediatric Patients // *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics : JPPT*. 2018. № 2 (23). С. 111.
168. Singh N., Bhalla N. Moonlighting Proteins 2020.
169. Smedley D. [и др.]. BioMart - Biological queries made easy // *BMC Genomics*. 2009. № 1 (10). С. 1–12.
170. Son K. [и др.]. A Simple Guideline to Assess the Characteristics of RNA-Seq Data 2018.
171. Sonesson C., Love M. I., Robinson M. D. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences // *F1000Research*. 2015. (4).

172. Soos M. A., Field C. E., Siddle K. Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity // *Biochemical Journal*. 1993. № 2 (290). С. 419–426.
173. Stallings J. D. [и др.]. Nuclear Translocation of Phospholipase C- δ 1 Is Linked to the Cell Cycle and Nuclear Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. № 23 (280). С. 22060–22069.
174. Starremans P. G. [и др.]. A mouse model for polycystic kidney disease through a somatic in-frame deletion in the 5' end of Pkd1 // *Kidney International*. 2008. № 12 (73). С. 1394–1405.
175. Su Y. [и др.]. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is required for band 3 (anion exchanger 1) membrane residency in the mammalian kidney // <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00228.2010>. 2011. № 1 (300). С. 157–166.
176. Subramanya A. R., Ellison D. H. Distal convoluted tubule // *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2014. № 12 (9). С. 2147–2163.
177. Takahashi N. [и др.]. Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000. № 10 (97). С. 5434–5439.
178. Takvam M. [и др.]. Role of the kidneys in acid-base regulation and ammonia excretion in freshwater and seawater fish: implications for nephrocalcinosis // *Frontiers in Physiology*. 2023. (14). С. 1226068.
179. Talbi K. [и др.]. Gender-dependent phenotype in polycystic kidney disease is determined by differential intracellular ca^{2+} signals // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. № 11 (22). С. 6019.
180. Tanios B. Y. [и др.]. Carbonic anhydrase inhibitors in patients with respiratory failure and metabolic alkalosis: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // *Critical Care*. 2018. № 1 (22). С. 1–12.
181. Tezcan M. E. [и др.]. Baseline electrolyte abnormalities would be related to poor prognosis in hospitalized coronavirus disease 2019 patients // *New microbes and new infections*. 2020. (37).
182. Thibodeau J.-F. [и др.]. A Novel Mouse Model of Advanced Diabetic Kidney Disease.
183. Tobar A. [и др.]. Proximal Tubular Hypertrophy and Enlarged Glomerular and Proximal Tubular Urinary Space in Obese Subjects with Proteinuria // *PLOS ONE*. 2013. № 9 (8). С. e75547.
184. Usoskin D. [и др.]. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing // *Nature Neuroscience*. 2015. № 1 (18). С. 145–153.
185. Vincent A. M., Feldman E. L. Control of cell survival by IGF signaling pathways // *Growth Hormone and IGF Research*. 2002. № 4 (12). С. 193–197.

186. Vrhovac I. [и др.]. Localizations of Na⁺-d-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 in human kidney and of SGLT1 in human small intestine, liver, lung, and heart // *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2014 467:9. 2014. № 9 (467). С. 1881–1898.
187. Wang J. [и др.]. Physiological and Pathological Functions of SLC26A6 // *Frontiers in Medicine*. 2021. (7). С. 618256.
188. Warth R. [и др.]. Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport. 2004.
189. Warth R. [и др.]. Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K⁺ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004. № 21 (101). С. 8215–8220.
190. Watanabe S. [и др.]. Association between activating mutations of calcium-sensing receptor and Bartter's syndrome // *Lancet*. 2002. № 9334 (360). С. 692–694.
191. Watts B. A., Good D. W. Apical membrane Na⁺/H⁺ exchange in rat medullary thick ascending limb. pH-dependence and inhibition by hyperosmolality. // *Journal of Biological Chemistry*. 1994. № 32 (269). С. 20250–20255.
192. Weber A. [и др.]. Coexpression of Insulin Receptor-Related Receptor and Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Correlates with Enhanced Apoptosis and Dedifferentiation in Human Neuroblastomas // *Clinical Cancer Research*. 2003. № 15 (9). С. 5683–5692.
193. Wehrman T. [и др.]. Structural and Mechanistic Insights into Nerve Growth Factor Interactions with the TrkA and p75 Receptors // *Neuron*. 2007. № 1 (53). С. 25–38.
194. Wei K., Ma L. Concept development of housekeeping genes in the high-throughput sequencing era. // *Yi Chuan = Hereditas*. 2017. № 2 (39). С. 127–134.
195. Weiner I. D., Verlander J. W. Renal Ammonia Metabolism and Transport // *Comprehensive Physiology*. 2013. № 1 (3). С. 201.
196. Weiner I. D., Verlander J. W. Ammonia transport in the kidney by Rhesus glycoproteins // *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2014. № 10 (306).
197. Wesson D. E. Molecular Biology and Physiology of Endothelin in the Kidney Endothelins and Kidney Acidification // *Contrib Nephrol. Basel, Karger*. 2011. (172). С. 84–93.
198. Wicks S. E. [и др.]. Diet-induced obesity and kidney disease-in search of a susceptible mouse model HHS Public Access // *Biochimie*. 2016. (124). С. 65–73.
199. Wright E. M. invited review Renal Na-glucose cotransporters 2001.
200. Wu H. [и др.]. Effects of Environmental pH on Macrophage Polarization and Osteoimmunomodulation // *ACS Biomaterials Science and Engineering*. 2019. № 10 (5). С. 5548–5557.
201. Yang C., Chen E. A., Zhang Y. Protein–Ligand Docking in the Machine-Learning Era // *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 4568. 2022. № 14 (27). С. 4568.

202. Yasui M. [и др.]. Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. 1999.
203. Yu G. [и др.]. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters // *OMICS A Journal of Integrative Biology*. 2012. № 5 (16). С. 284–287.
204. Yuzawa S. [и др.]. Structural Basis for Activation of the Receptor Tyrosine Kinase KIT by Stem Cell Factor // *Cell*. 2007. № 2 (130). С. 323–334.
205. Zacchia M. [и др.]. E-Mail Acid-Base, Electrolyte and Fluid Alterations: Review Potassium: From Physiology to Clinical Implications Network of Diagnosis and Management of Acid-Base, Electrolyte, and Fluid Alterations «Diagnosis and Management of Acid-Base, Electrolyte and Fluid Alterations in Critically Ill Patients» held in Shanghai and Hangzhou // *Kidney Dis*. 2016. (2). С. 72–79.
206. Zacchia M. [и др.]. The importance of the thick ascending limb of Henle's loop in renal physiology and pathophysiology // *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*. 2018. № 10 (14). С. 11–81.
207. Zaidman N. A., Pluznick J. L. Understudied G Protein-Coupled Receptors in the Kidney // *Nephron*. 2022. № 3 (146). С. 278.
208. Zhang H. [и др.]. Identification of INSR as an immune-related gene in the tumor microenvironment of glioblastoma by integrated bioinformatics analysis // *Medical Oncology*. 2023. № 6 (40). С. 1–12.
209. Zhang X. [и др.]. An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor // *Cell*. 2006. № 6 (125). С. 1137–1149.
210. Zhong J. [и др.]. Potential Theranostic Roles of SLC4 Molecules in Human Diseases // *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 15166. 2023. № 20 (24). С. 15166.
211. Zubkov E. A. [и др.]. Behavioral Characteristics of Mice with Knockout of the IRR Alkali Sensor Gene // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2018. № 4 (48). С. 483–487.