

УДК 616.152.118-085-019

А.Г. Петренко

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КОМПЕНСАЦИИ АЛКАЛОЗА

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

**Резюме.** Нами впервые в мире был найден метаболитный рецептор, являющийся клеточным сенсором слабощелочной среды. Им оказалась ранее считавшаяся «сиротской» рецепторная тирозинкиназа, член минисемейства инсулинового рецептора, получившая название инсулиновый рецептор-подобный рецептор (ИРР). Наибольшее количество ИРР выявлено в почках, где он обнаруживается лишь в субпопуляции вставочных клеток, выстилающих дистальные каналцы и секретирующих бикарбонат в почечный фильтрат. Мы установили, что естественным лигандом и активатором ИРР является гидроксил-анион, а ИРР выполняет функцию щелочного сенсора. Для анализа системной роли ИРР в регуляции

кисотно-щелочного равновесия нами была использована линия нокаутных мышей с генетически инактивированным геном ИРР. Измерение pH и бикарбоната в крови и моче мышей после щелочной нагрузки показало, что инактивация гена ИРР приводит к отсутствию правильного ответа почек, увеличивающих секрецию избыточного бикарбоната. Компенсация острого экспериментального алкалоза у нокаутных мышей достигалась за счет повышения концентрации  $\text{CO}_2$  в крови.

**Ключевые слова:** кислотно-щелочное равновесие, вставочные клетки, экскреция бикарбоната, нокаутные мыши, алкалоз.

**Введение.** Постоянство кислотно-щелочного равновесия является важнейшим свойством всех живых организмов. Одним из проявлений почечной недостаточности может быть развитие системного алкалоза, т.е. повышение pH крови выше физиологической нормы. При отсутствии компенсации алкалоз представляет непосредственную угрозу жизни и требует неотложной реанимационной терапии.

**Цель исследований.** Выяснение клеточных и молекулярных механизмов регуляции кислотно-щелочного равновесия и, в частности, изучение природных механизмов компенсации алкалоза.

**Материал и методы.** Исследования проведены на «нокаутных» мышах с генетически инактивированным геном инсулинового рецептор-подобного рецептора (ИРР) [6]. Мыши были получены путем экстракорпорального оплодотворения замороженной спермой мышей, трижды «нокаутных» по гену минисемейства рецептора инсулина [4].

С целью изучения состояния кислотно-щелочного равновесия нокаутных мышей переводили на щелочное питье. При щелочной нагрузке питьевую воду заменяли 0,28 М раствором бикарбоната натрия  $\text{NaHCO}_3$ . С целью исключения влияния натрия контрольных животных поили 0,28 М раствором хлорида натрия  $\text{NaCl}$  вместо 0,28 М раствора бикарбоната натрия  $\text{NaHCO}_3$ . Пробы крови и мочи забирали у животных через 7 дней.

У части нокаутных мышей моделировали острый экспериментальный алкалоз. При этом животным в хвостовую вену в течение 5 с вводили 1,3 % раствор  $\text{NaHCO}_3$  (200 мкл / 10 г массы тела). За 30 мин до введения  $\text{NaHCO}_3$ , а также через 5 и 15 мин после введения из ретроорбитального синуса забирались образцы крови в пластиковые капилляры (обработанные Lithin-гепарином, 50 ед / мл).

Состояние кислотно-щелочного равновесия анализировали по пробам крови и мочи живот-

ных с помощью газоанализатора Rapidpoint 405 (Siemens), а также газоанализатора ABL 725 (Radiometer, Копенгаген, Дания) [3, 4].

**Результаты исследования и их обсуждение.**

Нами впервые в мире был найден метаболитный рецептор, являющийся клеточным сенсором слабощелочной среды. Им оказалась ранее считавшаяся «сиротской» рецепторная тирозинкиназа [8], член минисемейства инсулинового рецептора, получившая название инсулиновый рецептор-подобный рецептор (ИРР, IRR). ИРР экспрессируется только в определенных популяциях клеток в отдельных тканях. Наибольшее количество ИРР выявлено в почках, где он обнаруживается лишь в субпопуляции эпителиальных клеток, выстилающих дистальные каналцы и секретирующих бикарбонат в почечный фильтрат [1, 7]. Данные клетки непосредственно контактируют с почечным фильтратом, pH которого, в отличие от крови, может существенно варьировать.

ИРР является членом минисемейства рецептора инсулина, куда также входит собственно рецептор инсулина и рецептор инсулин-подобного фактора роста [8]. Интересно, что ИРР абсолютно нечувствителен к инсулину и инсулин-подобному ростовому фактору [8, 9]. На сегодняшний день пептидно-белковые агонисты ИРР не найдены [5]. Мы установили, что естественным лигандом и активатором ИРР является гидроксил-анион, а ИРР исполняет функцию щелочного сенсора клетки [2]. Заметная активация рецептора ИРР наблюдалась при  $\text{pH} > 8.0$ . В подтверждение данной гипотезы было найдено, что pH чувствительность ИРР определяется структурными особенностями его внеклеточной части. В результате анализа сигнального пути, активируемого ИРР после обработки щелочной средой, было выявлено рецептор-зависимое фосфорилирование субстрата инсулинового рецептора и фосфатазы Akt. Также наблюдались изменения в структуре клеточного цитоскелета [3].

Для анализа системной роли ИРР в регуляции кислотно-щелочного равновесия нами была использована линия т.н. нокаутных мышей с генетически инактивированным геном ИРР [6]. Данные мыши жизнеспособны и в нормальных условиях не проявляют сильно выраженных патологических изменений. Мы определили 11 параметров крови мышей из групп дикого и нокаутного типа в обычных условиях [4]. Оказалось, что у мышей, нокаутных по рецептору ИРР, более высокое содержание бикарбоната в крови ( $22,9 \pm 1,0$  против  $19,9 \pm 0,6$ ), несколько повышен рН ( $7,29 \pm 0,03$  против  $7,21 \pm 0,02$ ) и гематокрит ( $54 \pm 1,1$  против  $50 \pm 1,0$ ). Остальные параметры практически не отличались в двух группах. Также у нокаутных мышей были обнаружены повышенный вес и увеличенная частота сердечных сокращений.

При введении в диету животных бикарбоната натрия нами была обнаружена почечная недостаточность у мышей, проявлявшаяся в существенном (примерно двухкратном) снижении их диуреза. Измерение рН и бикарбоната в крови и моче мышей после щелочной нагрузки в диете показало, что инактивация гена ИРР приводит к отсутствию правильного ответа почек, компенсирующего алкалоз путем секреции избыточного бикарбоната [3]. У нормальных мышей, концентрация бикарбоната в моче увеличивалась от 18 до 57 мМ, а рН мочи возрастал от 6,0 до 6,7. Напротив, у нокаутных мышей наблюдалось небольшое, в пределах статистической погрешности, снижение концентрации бикарбоната и рН мочи в ответ на введение бикарбоната. В крови нормальных животных бикарбонат и рН немного повышались в пределах статистической погрешности, а у нокаутных мышей рН поднимался от 7,26 до 7,34, а бикарбонат от 22 до 24,5 мМ. Также была обнаружена сниженная экспрессия в почках нокаутных мышей пендрина и протонного насоса, двух белковых маркеров бета-вставочных клеток почки, которые секретируют бикарбонат.

В условиях острого экспериментального алкалоза, индуцированного путем введения внутривенно 1 %  $\text{NaHCO}_3$  или 0,9 %  $\text{NaCl}$  (контроль) в объеме 1 мл / 100 г веса тела мыши, на 5-ой минуте после введения щелочного раствора динамика изменения концентрации бикарбоната и рН крови у нокаутных мышей была такая же, как и у мышей дикого типа – наблюдалось повышение рН крови и увеличение содержания в ней бикарбоната. На 15-ой минуте рН крови снижался, возвращаясь к норме, у мышей обеих групп, однако понижение рН крови у мышей дикого типа было сопряжено с понижением концентрации бикарбоната, тогда как у нокаутных мышей происходило повышение концентрации  $\text{CO}_2$  и уменьшение концентрации кислорода, а снижения концентрации бикарбоната не наблюдалось [4].

## Выводы

1. Клеточный сенсор слабощелочной среды инсулиновый рецептор-подобный рецептор является регулятором экскреции избыточной щелочи в почках при алкалозе.

2. Обычные и нокаутные мыши с инактивированным геном инсулиновый рецептор-подобный рецептор используют отличные от обычных мышей физиологические механизмы для компенсации алкалоза и в дальнейших исследованиях могут служить животной моделью некомпенсированного алкалоза.

## Перспективы дальнейших исследований.

На нокаутных мышках исследовать состояние кислотно-щелочного равновесия при различных патологических состояниях.

## Литература

1. Insulin receptor-related receptor expression in non-A intercalated cells in the kidney / C.M. Bates, J.M. Merenmies, K.S. Kelly-Spratt [et al.] // *Kidney Int.* – 1997. – Vol. 52, № 3. – P. 674-681.
2. Effect of changes in ambient pH on phosphorylation of cellular proteins / I.E. Deev, K.P. Vasilenko, E. Kurmangaliev [at al.] // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2006. – Vol. 408. – P. 184-187.
3. Insulin receptor-related receptor as an extracellular alkali sensor / I.E. Deyev, F. Sohet, K.P. Vasilenko [at al.] // *Cell Metabolism.* – 2011. – Vol. 13, № 6. – P. 679-689.
4. Deficient Response to Experimentally Induced Alkalosis in Mice with the Inactivated *insrr* Gene / I.E. Deyev, D.I. Rzhovsky, A.A. Berchatchova [at al.] // *Acta Naturae.* – 2011. – Vol. 3, № 4. – P. 114-117.
5. Expression of the insulin receptor-related receptor is induced by the preovulatory surge of luteinizing hormone in thecal-interstitial cells of the rat ovary / G.A. Dissen, C. Garcia-Rudaz, V. Tapia [at al.] // *Endocrinology.* – 2005. – Vol. 147, № 1. – P. 155-165.
6. Preserved pancreatic beta-cell development and function in mice lacking the insulin receptor-related receptor / T. Kitamura, Y. Kido, S. Nef [et al.] // *Mol. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 21, № 16. – P. 5624-5630.
7. Localization of insulin receptor-related receptor in the rat kidney / K. Ozaki, N. Takada, K. Tsujimoto [at al.] // *Kidney Int.* – 1997. – Vol. 52, № 3. – P. 694-698.
8. Shier P. Primary structure of a putative receptor for a ligand of the insulin family / P. Shier, V. M. Watt // *J. Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 264, № 25. – P. 14605-14608.
9. Shier P. Tissue-specific expression of the rat insulin receptor-related receptor gene / P. Shier, V.M. Watt // *Mol. Endocrinol.* – 1992. – Vol. 6, № 5. – P. 723-729.

## МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ КОМПЕНСАЦІЇ АЛКАЛОЗУ

А.Г. Петренко

**Резюме.** Нами вперше у світі був знайдений метаботропний рецептор, який є клітинним сенсором слабколузкого середовища. Ним виявився член мінісімейства інсулінового рецептора, що отримав назву інсуліновий рецептор-подібний рецептор (ІРР), який раніше вважався «сирітською» рецепторною тирозинкіназою. Найбільшу кількість ІРР виявлено в нирках, де він виявляється лише в субпопуляції вставних клітин, що вистилають дистальні каналці і секретують бікарбонат у нирковий фільтрат. Ми встановили, що природним лігандом і активатором ІРР є гідроксил-аніон, а ІРР виконує функцію лужного сенсора. Для аналізу системної ролі ІРР у регуляції кислотно-лужної рівноваги нами використана лінія нокаутних мишей з генетично інактивованим геном ІРР. Вимірювання рН і бікарбонату в крові та сечі мишей після лужного навантаження показало, що інактивація гена ІРР призводить до відсутності правильної відповіді нирок, що збільшує секрецію надлишкового бікарбонату. Компенсація гострого експериментального алкалозу в нокаутних мишей досягалася за рахунок підвищення концентрації  $\text{CO}_2$  в крові.

**Ключові слова:** кислотно-лужна рівновага, вставні клітини, екскреція бікарбонату, нокаутні миші, алкалоз.

## THE MOLECULAR MECHANISMS OF ALKALOSIS COMPENSATION

A.G. Petrenko

**Abstract.** A metabotropic receptor, being a cellular sensor of a mild alkaline medium has been discovered by us for the first time in the world. It turned out to be a previously regarded “orphaned” receptor – tyrosine kinase, a member of the insulin receptor minifamily named an insulin receptor-like receptor (IRR). The largest amount of IRR has been revealed in the kidneys where it is detected only in a subpopulation of intercalated cells, lining the distal tubules and secreting bicarbonate into the renal filtrate. We have established the hydroxyl anion is a natural ligand and activator of IRR whereas IRR performs the function of an alkaline sensor. In order to analyze the systemic role of IRR in the regulation of acid-base balance we used knock-out mice with a genetically inactivated IRR gene. A measurement of pH and blood and urinary bicarbonate in mice following an alkaline load has shown that an inactivation of the IRR gene results in the absence of the right response of the kidneys, increasing the secretion of acute experimental alkalosis in the knock-out mice was achieved at the expense of an elevated  $\text{CO}_2$  concentration.

**Key words:** acid-base balance, intercalated cells, excretion of bicarbonate, knock-out mice, alkalosis.

Institute of Bioorganic Chemistry Named after Acad. M.M. Shemyakin and Acad. Yu.A. Ovchinnikov of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russian Federation)

Рецензент – проф. І.І. Заморський

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 3 (63), part 2. – P. 181-183

Надійшла до редакції 30.08.2012 року

© А.Г. Петренко, 2012

УДК 612.46:612.017.2

*В.П. Пішак, М.І. Кривчанська, М.І. Грицюк, Ю.В. Ломакіна, В.Г. Хоменко*

## ПОКАЗНИКИ НИРКОВИХ ФУНКЦІЙ ЗА УМОВ СТАНДАРТНОГО РЕЖИМУ ОСВІТЛЕННЯ ТА ДІЇ АНАПРИЛІНУ

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці, Україна

**Резюме.** У статті наведені особливості показників ниркових функцій за умов стандартного режиму освітлення та дії анаприліну. Це має важливе значення для пізнання часової організації ренальних функцій, розуміння природи хронопатологічних явищ.

**Ключові слова:** хроноритми, анаприлін, функції нирок,  $\beta$ -адреноблокатори,  $\beta$ -адренорецептори.

**Вступ.** Тісна взаємодія організму з навколишнім середовищем підтримується складною, саморегульованою системою гомеостазу, здатною одночасно поєднувати і контролювати різноманітні функціональні процеси. Важливе місце в регуляції гомеостазу відіграють нирки. Цьому органу притаманна чітка циркадіанна періодичність.

**Мета дослідження.** Охарактеризувати циркадіанні зміни ниркових функцій за умов блокади  $\beta$ -адренорецепторів при стандартному режимі освітлення.

**Матеріал і методи.** Експерименти проведені на 75 білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою  $160 \pm 20$  г. Упродовж одного місяця

© В.П. Пішак, М.І. Кривчанська, М.І. Грицюк, Ю.В. Ломакіна, В.Г. Хоменко, 2012