

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРНАТРИЕМИИ НА РЕАБСОРБЦИЮ БЕЛКОВ В ПРОКСИМАЛЬНЫХ КАНАЛЬЦАХ ПОЧКИ ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*

© 2024 г. Н. П. Пруцкова^{1, *}, Е. В. Селиверстова¹

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

* e-mail: natprut@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.02.2024 г.

После доработки 12.03.2024 г.

Принята к публикации 17.03.2024 г.

Реабсорбция белков в проксимальных канальцах почек происходит одновременно с транспортом ионов и воды, однако мало что известно о зависимости рецептор-опосредованного эндоцитоза белка от изменений водно-солевого баланса. Целью исследования явилось изучение канальцевой реабсорбции и внутриклеточного везикулярного транспорта различных белков в модели гипернатриемии на озерных лягушках (*Pelophylax ridibundus*). В опытах лягушкам инъецировали гипертонический раствор хлорида натрия (0.75 М NaCl) за 1 ч до инъекции зеленого или желтого флуоресцентных белков (GFP или YFP), а также лизоцима. Для выявления лизоцима и рецептора эндоцитоза мегалина не срезах почек использовали метод флуоресцентной иммуногистохимии. Препараты изучали в лазерном сканирующем конфокальном микроскопе. На полученных изображениях определяли интенсивность флуоресцентных сигналов белков и мегалина в эпителиальных клетках проксимальных канальцев. Для изучения динамики эндоцитоза применяли автоматизированный метод количественной оценки колокализированных сигналов белка и мегалина. Установлено статистически достоверное снижение реабсорбции GFP, YFP и лизоцима в проксимальных канальцах после инъекций раствора NaCl по сравнению с контролем. Показано накопление белков в раннем эндоцитозном компартменте и снижение их поступления в поздние эндосомы и лизосомы, что рассматривается как свидетельство замедления внутриклеточного везикулярного транспорта при гипернатриемии. Полученные данные проанализированы в связи с изменениями показателей крови и деятельности почек в процессе осморегуляции, а также с ролью хлоридных каналов в рецептор-опосредованном эндоцитозе белков. Можно полагать, что усиление эпителиального транспорта ионов в проксимальных канальцах в условиях гипернатриемии приводит к снижению способности эпителиоцитов к реабсорбции белков и ингибированию их внутриклеточного транспорта в процессе эндоцитоза.

Ключевые слова: амфибии, лизоцим, мегалин, проксимальный каналец, реабсорбция белка, флуоресцентный белок, хлоридный канал

DOI: 10.31857/S0044452924030047, **EDN:** YXHQKW

ВВЕДЕНИЕ

Основные механизмы регуляции водно-солевого баланса и эпителиального канальцевого транспорта, действующие в почках амфибий, во многом сходны с таковыми у млекопитающих. Это позволяет использовать амфибий в качестве экспериментальных моделей для изучения физиологических процессов, действующих в почках позвоночных животных, включая фундаментальные и эволюционные аспекты [1]. Как известно, реабсорбция белков в почке происходит в проксимальных канальцах нефронов. Согласно установленному рецептор-опосредованному клатрин-зависимому пути [2–4], эндоцитоз белка начинается с его взаимодействия с рецепторами (мегалином и кубилином) на апикальной плазматической мембране и интернализации это-

го комплекса в составе эндоцитозных везикул при участии клатрина и адаптерных белков. После распада лиганд-рецепторного комплекса в эндосомах и рециклинга рецепторов на апикальную мембрану осуществляется последующий везикулярный транспорт абсорбированных макромолекул и их утилизация в лизосомах. Основным рецептором, вовлеченным в захват и внутриклеточный транспорт белков, является мегалин — гигантский трансмембранный белок, принадлежащий к семейству рецепторов липопротеинов низкой плотности [4–7]. Присутствие мегалина на апикальной мембране эпителиоцитов служит четким критерием для идентификации проксимальных канальцев в срезах почек [8]. У млекопитающих, рыб и амфибий установлена идентичность молекулярных механизмов эндоцитоза белка [8–11]. В исследованиях на лягушках нами было показано

участие рецепторов мегалина (мегалин/Irp2) и кубилина в захвате зеленого и желтого флуоресцентных белков (GFP и YFP), лизоцима и альбумина [11–13].

В проксимальных канальцах почек амфибий одновременно с профильтрованными белками реабсорбируется от 20 до 45 % Na^+ и Cl^- , основных ионов плазмы крови [14]. В структурах почки разными методами идентифицированы основные транспортные белки, участвующие в перемещении Na^+ и Cl^- [15]. В то же время мало что известно об их локализации и функциональной роли в клетках проксимальных канальцев, в отличие от дистальных сегментов нефрона и собирательных трубок, в которых на апикальной мембране эпителиоцитов имеются эпителиальный натриевый канал и Na^+/H^+ -обменник [16–19]. Некоторые белки семейства генов хлоридных каналов клонированы у лягушек рода *Xenopus*, в том числе хлоридные каналы xClC-5 и xClC-3 [20] с идентичностью 78–90 % в сравнении с аналогичными каналами млекопитающих и человека, ClC-5 и ClC-3 . Однако их функциональную экспрессию изучали преимущественно в ооцитах *Xenopus* или в клеточных линиях млекопитающих [21]. В то же время установлено, что у млекопитающих и человека хлоридные каналы участвуют в процессе эндоцитоза белка в проксимальных канальцах. От функционирования ClC-3 и ClC-5 зависит величина pH в эндоцитозных везикулах и эффективность гидролиза белка в лизосомах [21–23]. У мышей с нокаутом гена канала ClC-5 , а также у пациентов с болезнью Дента, обусловленной мутацией этого гена, происходит ингибирование эндоцитоза белка в проксимальных канальцах [24].

Существующие у амфибий механизмы осморегуляции позволяют этим животным успешно адаптироваться к повышению солёности среды, при этом в крови существенно возрастает концентрация Na^+ , Cl^- и мочевины [25–27]. Имеются также данные о повышении осмоляльности крови и мочи у амфибий при парентеральном введении гипертонического раствора NaCl [26, 28–30]. В наших недавних исследованиях установлено, что у озерных лягушек в ответ на введение 0.75 М NaCl не только увеличивается осмоляльность крови и концентрации в ней Na^+ и Cl^- , но также повышаются диурез, осмоляльность мочи и экскреция Na^+ и Cl^- почками [31]. Таким образом, несмотря на отсутствие в нефронах амфибий петель Генле и, соответственно, механизма осмотического концентрирования мочи, продемонстрировано усиление осмо- и ионорегулирующей функции почек после инъекций NaCl . Одновременно методом иммунофлуоресцентной микроскопии установлено увеличение количества ClC-5 , локализованного в эпителиоцитах проксимальных канальцев [31].

Исходя из сопряженности процессов реабсорбции белка в проксимальных канальцах и транспорта ионов в этом отделе нефрона, а также роли хло-

ридных каналов на разных этапах эндоцитоза, возникает вопрос о связи канальцевой реабсорбции белка с повышением концентрации в крови осмотически активных веществ. Целью исследования явилось изучение реабсорбции белка в почках лягушек в физиологической модели изменений водно-солевого баланса. В задачи работы входила оценка эффекта инъекций гипертонического раствора NaCl на реабсорбцию различных белков в почках озерных лягушек, а также динамики белкового транспорта в процессе рецептор-опосредованного эндоцитоза в эпителиоцитах проксимальных канальцев методами иммуногистохимии и конфокальной микроскопии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Озерные лягушки, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), были отловлены в Астраханской области и в периоде гибернации содержались в холодильной камере ЭБК ИЭФБ РАН при температуре 4 °С, в пластиковых контейнерах с водой. Опыты проводили с декабря до середины апреля. Перед экспериментами, животных помещали в индивидуальные контейнеры, заполненные водой до уровня 1–2 см, адаптировали к комнатной температуре в течение 1 ч и взвешивали. Масса тела лягушек, преимущественно самцов (64 %), составляла 96 ± 4 г ($n=28$) при отсутствии достоверных различий между самцами и самками, а также лягушками контрольных и опытных серий. Все инъекции лягушкам осуществляли подкожно, в спинной лимфатический мешок. Изотонический 0.01 М фосфатно-солевой буфер (PBS) использовали для растворения вводимых веществ (осмоляльность 200 мОсм/кг H_2O , pH 7.4). Для моделирования гипернатриемии животным инъектировали 0.75 М NaCl в дозе 100 мкл/30 г массы тела, контрольным лягушкам вводили PBS в таком же объеме. Через 1 ч в контроле и опыте вводили маркерные белки в дозе 18 мкг/100 мкл/30 г массы тела для тестирования реабсорбции в проксимальных канальцах. В разных сериях использовали зеленый или желтый флуоресцентные белки (GFP, YFP, Институт белка, РАН, Пущино-на-Оке, Россия), а также лизоцим (Sigma Aldrich Inc., США). Через 20 мин после введения белка лягушек обездвигивали, разрушая спинной мозг с помощью препаровательной иглы, быстро извлекали почки для дальнейшей препаровки и фиксации образцов и проводили эвтаназию путем декапитации.

Образцы ткани почек фиксировали в 4 % растворе параформальдегида и обрабатывали, как описано ранее [13]. Срезы (толщиной 5–7 мкм) из разных частей почки получали в криостате CM 1510 (Leica Microsystems, Germany). В иммуногистохимических исследованиях применяли кроличьи поликлональные антитела к лизоциму (Abcam, США)

в разведении 1:200 и мышинные моноклональные антитела к мегалину/LRP2 (MyBioSource, США; Acris, Origene Technologies, США) в разведении 1:1000, а также флуоресцентные конъюгаты козьих антикроличьих и обезьяньих антимышиных иммуноглобулинов (IgGs) с Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 568 в разведении 1:500 (Invitrogen, Molecular Probes, США), согласно описанному ранее протоколу [11]. Срезы монтировали на предметные стекла, заключали в мовиол и изучали в конфокальном микроскопе DMI 6000 с лазерной приставкой Leica SP II (Leica Microsystems, Германия), используя объектив 40х. В режиме лазерного сканирования использовали спектры возбуждения с длинами волн 488, 513 и 568 нм, регистрируя в различных частях спектра свечение Alexa Fluor 488 и GFP (500–520 нм), YFP (515–550 нм) и Alexa Fluor 568 (590–650 нм), соответственно. Последовательное сканирование в этих каналах и проходящем свете осуществляли при одних и тех же настройках микроскопа.

Изображения анализировали, пользуясь программой ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov>). В надгломерулярной зоне почек подсчитывали относительное число профилей проксимальных канальцев со свечением GFP, YFP или иммунофлуоресценцией лизоцима (% к общему числу мегалин-позитивных проксимальных канальцев), используя 20 изображений для каждой лягушки. В отдельных канальцах, выбранных случайным образом (30 проксимальных канальцев для каждой особи), определяли интенсивность флуоресцентного сигнала (оптическую плотность, в условных единицах (усл. ед.)) в надъядерной области клеток эпителиального слоя, включая апикальную и субапикальную цитоплазму. На совмещенных изображениях визуализировали свечение белка (зеленое), рецептора (красное), а также колокализованное свечение (желто-оранжевое). Для количественной оценки соотношения этих сигналов использовали плагин (<http://sibarov.ru/index.php?slab=software>) для программы ImageJ. Для каждой пары изображений, полученных в красной и зеленой спектральной области, создавали точечные диаграммы, на которых значения интенсивности пикселей на первом изображении отложены по оси X, а значения соответствующих пикселей на втором изображении — по оси Y. Автоматически рассчитывали количество пикселей со свечением в красной и зеленой области спектра, а также пикселей с перекрытием сигналов относительно общего числа светящихся пикселей с интенсивностью сигнала выше эмпирически установленного порога (75 усл. ед.). Используя 20 пар изображений для каждой лягушки, определяли общее количество пикселей со свечением абсорбированного белка и процентное соотношение колокализованного и неколокализованного белка. Данные предварительно проверяли

на соответствие закону нормального распределения (тест Шапиро–Уилка). Основные показатели представляли как медиану с верхним и нижним квартилем [Me (Q1; Q3)], в отдельных случаях — в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm SEM$). Для сравнения независимых групп данных использовали Т-критерий Манна–Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Для расчетов и статистической обработки данных пользовались программами ImageJ и Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На совмещенных изображениях представлен паттерн реабсорбции GFP, YFP или лизоцима в эпителии проксимальных канальцев почек через 20 мин после инъекции (рис. 1). Введенные белки были визуализированы в многочисленных мегалин-позитивных проксимальных канальцах (рис. 1a–c). В почках отдельных контрольных лягушек относительное количество канальцев со свечением флуоресцентных белков было в пределах 60–90% для GFP и 71–81% для YFP, а метка к лизоциму присутствовала в 88–94% канальцев. Мегалин выявлялся в апикальной зоне эпителиоцитов, где частично был колокализован с поступившим в клетки белком, а не связанный с рецептором белок присутствовал в апикальной цитоплазме и более удаленных от люминальной мембраны областях (рис. 1). Значительное число эндоцитозных везикул, содержащих GFP или лизоцим хорошо видно при большем увеличении (рис. 1d, e). Зона колокализации белка с рецептором наиболее отчетливо выявлялась после введения лизоцима (рис. 1c, e, f). Метка к лизоциму, преимущественно везикулярная в контроле (рис. 1d), после инъекции 0.75 M NaCl была в значительной мере диффузной и часто присутствовала в щеточной каемке эпителиоцитов (рис. 1f). Предварительное введение 0.75 M NaCl привело к снижению процента профилей канальцев с меткой к лизоциму и не повлияло на распределение GFP и YFP в проксимальных канальцах (табл. 1).

При определении интенсивности флуоресценции GFP, YFP или лизоцима в апикальной зоне эпителиоцитов проксимальных канальцев у лягушек контрольных и опытных серий установлено достоверное снижение оптической плотности сигналов для каждого из введенных белков после предварительной инъекции NaCl (рис. 2).

Автоматизированный анализ изображений позволил сопоставить процент колокализации сигналов белка и мегалина в контроле и на фоне инъекций NaCl. В качестве примера приведен результат оценки эндоцитоза GFP (рис. 3). На совмещенном изображении (рис. 3a) видно преобладание в контроле зеленого сигнала GFP, а желто-оранжевого свече-

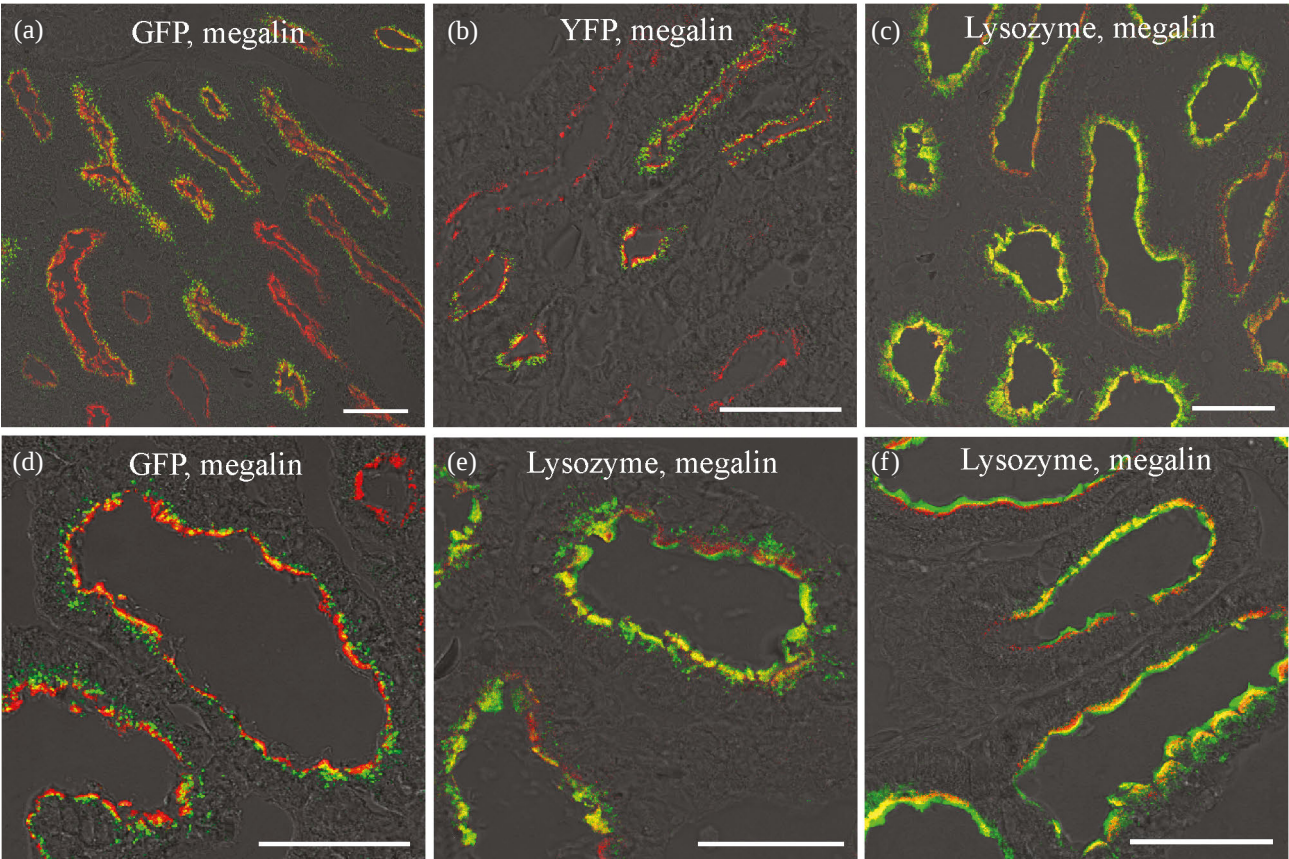


Рис. 1. Реабсорбция GFP, YFP и лизоцима (Lysosome) в иммунопозитивных к мегалину (megalin) проксимальных канальцах почек у озерных лягушек. (a–f) – профили проксимальных канальцев в контроле (a–e) и после предварительного введения NaCl (f). Сигналы: мегалин-Alexa 568 – красный, GFP, YFP и лизоцим-Alexa 488 – зелёный и колокализованное свечение – желто-оранжевый. Видно присутствие белков в большинстве мегалин-позитивных канальцев (a–c), образование многочисленных GFP-содержащих везикул (d), везикулярное и диффузное свечение лизоцима (e, f) и аккумуляция лизоцима в щётчатой каемке эпителиоцитов (f). Конфокальная микроскопия, совмещённые изображения. Калибровка: 50 мкм.

Таблица 1. Реабсорбция различных белков в проксимальных канальцах почек у озерных лягушек

Введенный белок	Число канальцев с реабсорбированным белком через 20 мин после инъекции (в % к мегалин-позитивным канальцам)			
	Контроль		Опыт	
	Me (Q1; Q3)	<i>n</i>	Me (Q1; Q3)	<i>n</i>
GFP	74.9 (67.3; 75.2)	7/140/2209	78.5 (70.1; 81.9)	6/120/1776
YFP	73.7 (72.3; 77.5)	3/60/759	71.9 (71.3; 73.3)	4/80/1078
Лизоцим	89.5 (88.9; 90.8)	4/80/1210	80.7 (78.7; 82.7)*	4/80/1442

Примечание: изотонический PBS (в контроле) и 0.75 M NaCl (в опыте) введены за 1 ч до инъекции белка. Достоверность различий по сравнению с контролем: * – $p < 0.05$ (Т-критерий Манна–Уитни); *n* – количество лягушек/изображений/канальцев.

ния (колокализованных сигналов GFP и мегалина) мало. На точечной диаграмме, представляющей распределение светящихся пикселей (рис. 3b), видно, что желто-оранжевых точек, соответствующих колокализации белка и рецептора, значительно меньше по сравнению с зелеными (в данном случае – 7 % и 54 % соответственно, относительно общего числа светящихся пикселей). После предварительного введения NaCl колокализованного свечения ста-

новится значительно больше, что видно на изображении (рис. 3c), и на точечной диаграмме (рис. 3d) преобладают пиксели с перекрытием сигналов по сравнению с сигналом только GFP (18 % и 6 % соответственно). Заметим, что абсолютное количество точек каждого цвета значения не имело, поскольку зависело от конкретного числа присутствующих на изображениях профилей проксимальных канальцев со свечением белка и мегалина. Для нас представля-

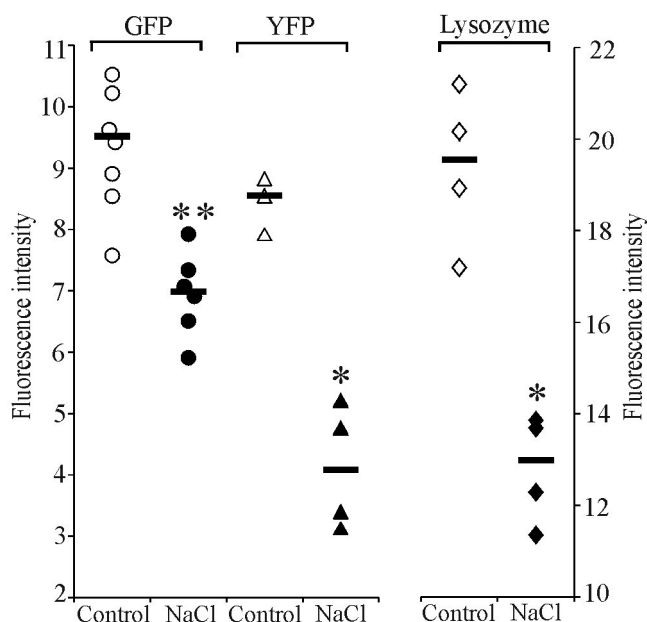


Рис. 2. Снижение реабсорбции GFP, YFP и лизоцима (Lysozyme) в проксимальных канальцах почек лягушек после предварительного введения NaCl. По оси ординат: интенсивность флуоресценции у отдельных лягушек (усл. ед.), слева — GFP (кружки) и YFP (треугольники), справа — лизоцима (ромбы); светлые значки — контроль (Control), темные значки — после инъекции 0.75 M NaCl; черная черта — медиана. Достоверность различий по сравнению с контролем: * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$ (Т-критерий Манна–Уитни).

ло интерес соотношение числа пикселей со свечением только белка и белка, колокализованного с рецептором. Если суммарное количество пикселей со свечением GFP принять за 100 %, то получается, что на первом изображении (рис. 3а) количество колокализованного белка составляет всего 12 %, а на втором (рис. 3с) — 74 %. Подобный расчет был применен ко всем сериям опытов с введением GFP, YFP и лизоцима. Установлено, что процент колокализации каждого из абсорбированных белков с мегалином достоверно увеличился под влиянием NaCl (рис. 4а). Соответственно, существенно изменилось соотношение колокализованного и неколокализованного белка в пользу первого (рис. 4б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В контрольных экспериментах паттерны мегалина, GFP, YFP и лизоцима в проксимальных канальцах почек не отличались от детально изученных ранее у амфибий [11–13] и были аналогичны таковым в эпителии проксимальных канальцев млекопитающих [32, 33]. Ранее было установлено, что введение 0.75 M NaCl озерным лягушкам приводит к гипернатриемии [31]. Как показало настоящее исследование, паттерн реабсорбции белков в проксимальных канальцах в этих условиях существенно не отличался от такового в контроле, за исключением сниже-

ния числа профилей канальцев, иммунопозитивных к лизоциму. В то же время установлено достоверное снижение интенсивности сигналов GFP, YFP и лизоцима, т. е. количества реабсорбированных белков. Наряду с этим изменялась динамика внутриклеточного транспорта в процессе эндоцитоза. После инъекции NaCl существенно возрастал процент колокализация белка с мегалином и снижалось относительное количество неколокализованного белка, т. е. белка в составе везикул (эндосом/лизосом), образовавшихся после распада белок-рецепторного комплекса и переместившихся из апикальной цитоплазмы в надъядерную и перинуклеарную зоны. Эти данные свидетельствуют о замедлении внутриклеточного транспорта белков. Эффект NaCl был установлен как для флуоресцентных белков, так и для лизоцима. Более того, установленный процент неколокализованного лизоцима можно считать даже заниженным, т. к. в его автоматизированный расчет попадала флуоресценция белка, не успевшего поступить в эпителиоциты и задержавшегося в зоне щеточной каемки. Как известно, процессы распада белок-рецепторного комплекса, рециклинга рецепторов и дальнейшего поступления белка в поздние эндосомы являются необходимыми этапами белкового трафика. От скорости этих процессов зависят аккумуляция и гидролиз белка в лизосомах с последующим использованием продуктов распада для пластического обмена и, таким образом, клиренс белка в организме. Выявленное на фоне гипернатриемии замедление эндоцитозного транспорта рассматривается нами как один из существенных факторов снижения абсорбционной способности клеток канальцев.

Имеются основания полагать, что наблюдаемое снижение реабсорбции белков является следствием существенных изменений водно-солевого баланса и тока ионов в составе канальцевой жидкости. Об этом свидетельствуют опубликованные ранее результаты инъекции 0.75 M NaCl на ионо- и осморегулирующую функции почек у озерных лягушек [31], которые соответствовали характерным лабораторным признакам гипертонической гипергидратации у человека. Так, через 60–80 мин после этого воздействия достоверно увеличивались осмоляльность сыворотки крови и содержание в ней Na^+ и Cl^- по сравнению с контролем, и аналогичные изменения наблюдались в моче. При этом отмечено усиление диуреза, скорости клубочковой фильтрации (СКФ) и экскреции Na^+ , K^+ и Cl^- . Реабсорбция в почках профильтровавшейся жидкости и растворенных в ней веществ имеет большое значение для поддержания водно-солевого гомеостаза. Согласно представлениям о гломеруло-тубулярном балансе, существует прямая, почти линейная зависимость между изменением СКФ и реабсорбцией веществ в проксимальном канальце [34]. При умеренном повыше-

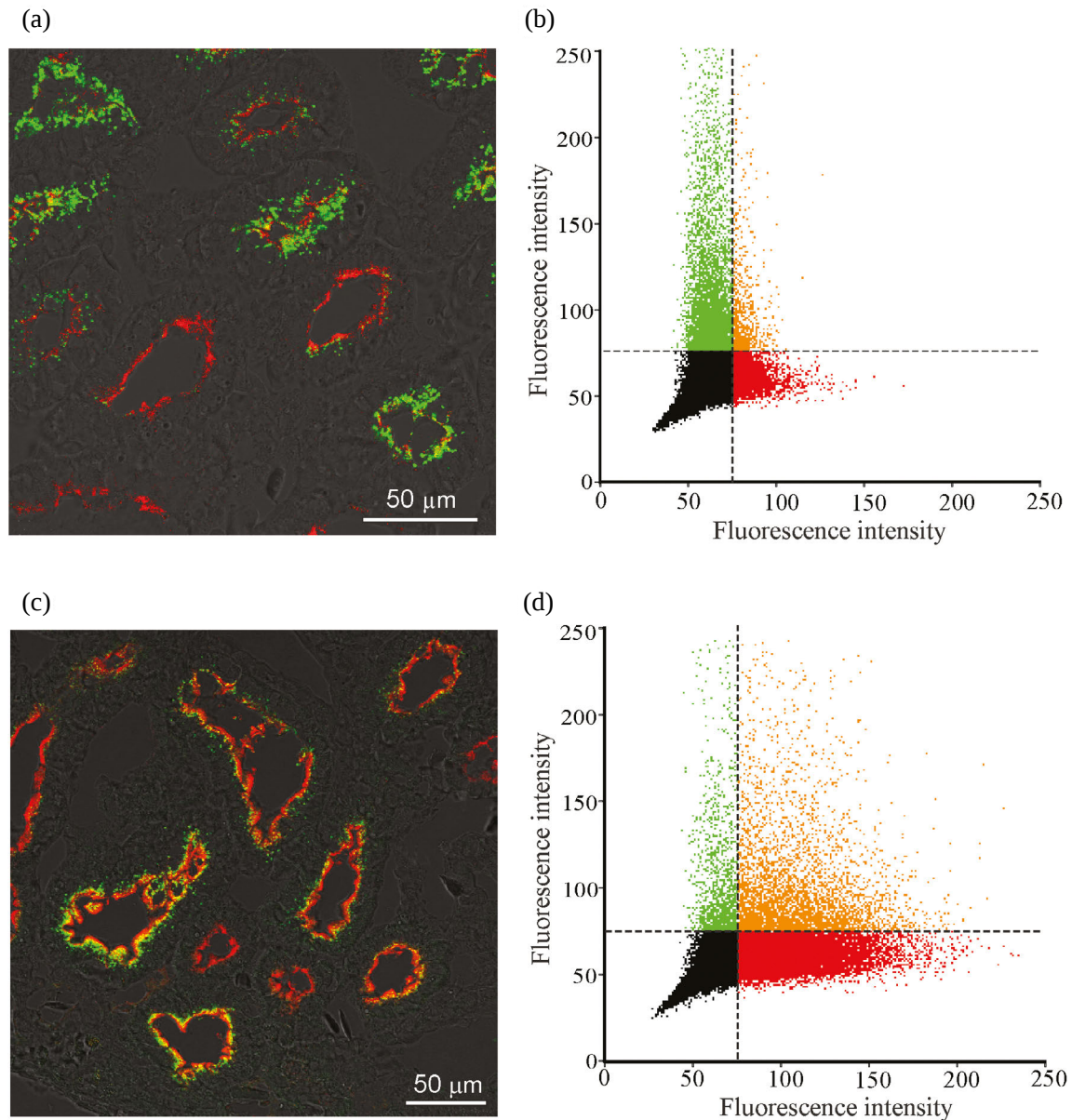


Рис. 3. Примеры автоматизированной количественной оценки и визуализации колокализованных флуоресцентных сигналов. (а) — GFP (зеленый), мегалин (красный) и колокализация сигналов (желто-оранжевый) в эпителии проксимальных канальцев в контроле. Конфокальная микроскопия, совмещенные изображения. Калибровка: 50 мкм. (б) — точечная диаграмма для изображения, представленного на (а). По оси абсцисс и ординат: интенсивность флуоресценции пикселей в красной и зеленой областях спектра, соответственно (в усл. ед.). Пиксели с перекрытием сигналов окрашены в желто-оранжевый цвет; пунктирные линии — пороги, отделяющие видимую флуоресценцию от темных пикселей. (с) и (д) — то же, что (а) и (б) для варианта с введением 0.75 M NaCl. Видно увеличение колокализации обоих сигналов по сравнению с контролем.

нии прохождения белков через клубочковый фильтр повышается как экскреция белков с мочой, так и канальцевая реабсорбция [35–37]. В то же время щелевые диафрагмы могут оказывать существенное сопротивление чрезмерному увеличению СКФ, что снижает поступление белка в ультрафильтрат, в отличие от потока жидкости [38]. Кроме того, предлагаемые модели зависимости реабсорбции белка от СКФ и тока жидкости в канальцах касаются, глав-

ным образом, альбумина, но не низкомолекулярных белков, а четких представлений о зависимости реабсорбции белка в проксимальных канальцах от гидродинамики канальцевой жидкости не имеется.

Ранее нами было продемонстрировано снижение захвата свободно фильтруемых GFP и лизоцима в проксимальных канальцах почек травяных и озерных лягушек под влиянием аргинин-вазотоцина, способного снижать СКФ, действуя опосредованно

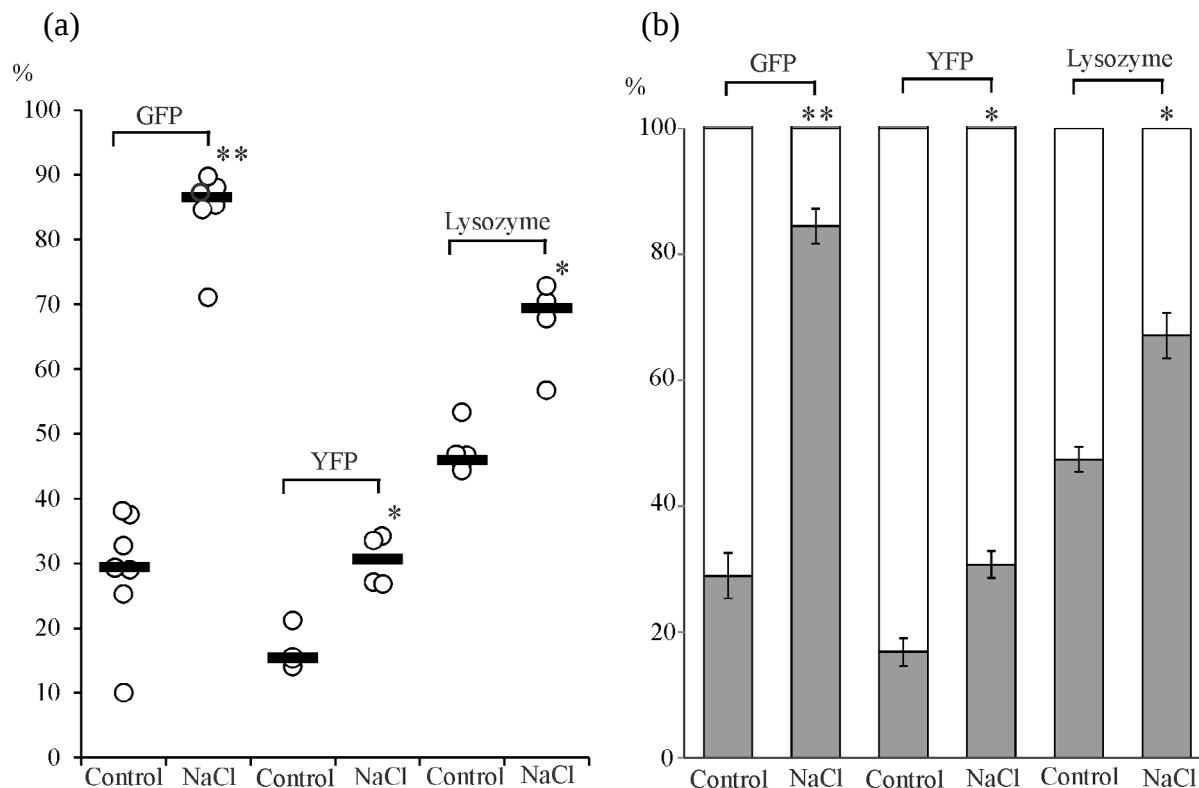


Рис. 4. Влияние инъекций 0.75 M NaCl на реабсорбцию и внутриклеточный транспорт GFP, YFP и лизоцима (Lysozyme) в проксимальных канальцах почек озерных лягушек. (a) — оценка колокализации введенных белков с мегалином в эпителии канальцев. По оси ординат: колокализованный белок (в % к общему количеству реабсорбированного белка) у отдельных лягушек (кружки) в контроле (Control) и после инъекции 0.75 M NaCl. Черная линия — медиана. (b) — соотношение колокализованного белка (темные столбцы) и неколокализованного белка (светлые столбцы) в тех же экспериментах. Данные представлены в виде $M \pm SEM$. Достоверность различий на (a) и (b): * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$ по сравнению с контролем (Т-тест Манна–Уитни).

через V1-подобные рецепторы прегломерулярных сосудов [39]. В настоящей работе выявлено уменьшение реабсорбции введенных белков в совершенно иных условиях, поскольку предварительно было показано, что инъекции 0.75 M NaCl приводят к увеличению СКФ [31]. Таким образом, нет ясности в механизмах, лежащих в основе выявленных нами изменений в захвате и внутриклеточном транспорте введенных белков. Имеются данные о том, что в норме эндоцитоз белка и контроль апикальной экспрессии аквапорина 1 в почках у мышей зависят от сопряженного функционирования мегалина и CIC-5 [40].

В наших исследованиях введение NaCl лягушкам повышало иммунофлуоресценцию CIC-5 в эпителии проксимальных канальцев без изменений паттерна и величины сигнала мегалина [31]. Известно, что белки семейства CLC представляют собой потенциал-зависимые хлоридные каналы плазматической мембраны и везикулярные Cl^-/H^+ -обменники [21]. В эпителиальных тканях эти белки вовлечены в различные процессы, включая эпителиальный транспорт, эндоцитоз, поддержание кислотно-щелочного баланса и регуляцию объема

клеток [20, 21]. Полагают, что в клетках проксимальных канальцев CIC-5 обеспечивает электрическое шунтирование, необходимое для подкисления эндосом и разобщения лиганд-рецепторного комплекса, и нарушением этого процесса объясняют протеинурию при болезни Дента [41].

В эпителиоцитах проксимальных канальцев CIC-5 присутствует непосредственно под апикальной мембраной, преимущественно в ранних эндосомах, где он колокализуется с абсорбированными белками и протонным насосом [22, 42, 43]. Возможно, в меньшем количестве CIC-5 присутствует в мембране микроворсинок [42]. В наших исследованиях на озерных лягушках CIC-5 был выявлен в везикулах апикальной и субапикальной цитоплазмы клеток проксимальных канальцев [31], и можно допустить, что у амфибий CIC-5 в эндоцитозных везикулах действует так же, как у млекопитающих. Инъекции 0.75 M NaCl приводили к появлению сигнала CIC-5 в виде яркой узкой полосы флуоресценции непосредственно под щеточной каемкой эпителиоцитов [31]. Возможно, рецепторный захват белка является триггером транспорта CIC-5 из везикулярного компартмента субапикальной цитоплазмы и надъ-

ядерной области эпителиоцитов в зону апикальной мембраны. Таким образом, у лягушек в условиях гипернатриемии можно констатировать повышение количества CIC-5 и его аккумуляцию вблизи цитоплазматической мембраны эпителиальных клеток. С другой стороны, в настоящем исследовании гипернатриемия приводила к снижению реабсорбции и замедлению транспорта белка, значительная часть которого задерживалась в апикальных эндосомах вместе с мегалином. Можно полагать, что участие CIC-5 в процессе эндоцитоза белка в условиях гипернатриемии снижается, несмотря на установленное увеличение его количества в эпителиоцитах, стимулом к которому могло быть повышение содержания Na^+ и Cl^- в просвете канальцев.

К сожалению, пока неизвестно, как в условиях гипернатриемии изменяется транспорт Na^+ , Cl^- и воды в люминальной мембране, что может влиять на характер функционирования CIC-5. Установлено, что CIC-5 является везикулярным $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обменником [21], но до конца не понятно, как этот антипорт способен нейтрализовать протонный насос, поскольку обеспечивает отток H^+ во время АТФ-зависимого подкисления эндосом. Существует мнение о том, что функции CIC-5 гораздо шире простого шунтирования протонного насоса, и CIC-5 может участвовать в механизмах модуляции проницаемости и электрического заряда мембран везикул [21, 44]. Предполагается, что нарушение эндоцитоза при болезни Дента является результатом не только снижения подкисления эндосом [22], оно может быть связано с “разобщением” градиентов Cl^- и H^+ в цитозоле и везикулах [45].

Согласно представленным результатам и изученным ранее эффектам введения гипертонического раствора NaCl на содержание в крови Na^+ и Cl^- , а также на ионо- и осморегулирующую функции почек у лягушек [31] мы считаем, что проявлением адаптивной реакции организма лягушек на уровне проксимальных канальцев почек прежде всего будут изменения транспорта воды и ионов в эпителиоцитах. Можно полагать, что в условиях гипернатриемии включаются механизмы гомеостатической регуляции, противодействующие внутриклеточной дегидратации и направленные на восстановление осмотического равновесия и объема клеток, а процесс реабсорбции белков приобретает второстепенное значение, что проявляется в снижении захвата и замедлении везикулярного транспорта белков.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея, планирование и дизайн экспериментов (Н.П.П., Е.В.С.), проведение опытов и сбор первичных данных (Н.П.П., Е.В.С.), иммуногистохимические исследования и конфокальная микроскопия (Е.В.С.), конфокальная микроскопия, анализ изображений и стати-

стическая обработка данных, подготовка иллюстраций (Н.П.П.), написание и редактирование текста рукописи (Н.П.П., Е.В.С.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и одобрены комиссией по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол № 11-1/2022 от 24.11.2022).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00264-24-00 на базе Центра коллективного пользования ИЭФБ РАН (ЦКП ИЭФБ РАН).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Д.А. Сибарову за консультативную помощь в использовании программного модуля для обработки изображений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Burggren WW, Warburton S (2007) Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. *Ilar J* 48 (3): 260–269. <https://doi.org/10.1093/ilar.48.3.260>
2. Christensen EI, Verroust PJ, Nielsen R (2009) Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *Pflügers Arch* 458 (6): 1039–1048. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0685-8>
3. Kumari S, Mg S, Mayor S (2010) Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Research* 20: 256–275. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.19>
4. De S, Kuwahara S, Saito A (2014) The endocytic receptor megalin and its associated proteins in proximal tubule epithelial cells. *Membranes* 4 (3): 333–355. <https://doi.org/10.3390/membranes4030333>
5. Moestrup SK, Verroust PJ (2001) Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr* 21: 407–428. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.407>
6. Christensen E, Birn H (2002) Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (4): 258–267. <https://doi.org/10.1038/nrm778>
7. Saito A, Sato H, Iino N, Takeda T (2010) Molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium. *J Biomed Biotechnol* 2010: 403272. <https://doi.org/10.1155/2010/403272>

8. Christensen EI, Birn H, Storm T, Weyer K, Nielsen R (2012) Endocytic receptors in the renal proximal tubule. *Physiology (Bethesda)* 27 (4): 223–236.
<https://doi.org/10.1152/physiol.00022.2012>
9. Anzenberger U, Bit-Avragim N, Rohr S, Rudolph F, Dehmel B, Willnow TE, Abdelilah-Seyfried S (2006) Elucidation of megalin/LRP2-dependent endocytic transport processes in the larval zebrafish pronephros. *J Cell Sci* 119: 2127–2137.
<https://doi.org/10.1242/jcs.02954>
10. Christensen E, Raciti D, Reggiani L, Verroust PJ, Brändli AW (2008) Gene expression analysis defines the proximal tubule as the compartment for endocytic receptor-mediated uptake in the *Xenopus* pronephric kidney. *Pflügers Arch* 456 (6): 1163–1176.
<https://doi.org/10.1007/s00424-008-0488-3>
11. Seliverstova EV, Romanova IV, Prutskova NP (2021) Molecular determinants of protein reabsorption in the amphibian kidneys. *Acta Histochem* 123 (6): 151760.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151760>
12. Prutskova NP, Seliverstova EV (2013) Absorption capacity of renal proximal tubular cells studied by combined injections of YFP and GFP in *Rana temporaria* L. *Comp Biochem Physiol A* 166: 138–146.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.05.022>
13. Seliverstova EV, Prutskova NP (2015) Receptor-mediated endocytosis of lysozyme in renal proximal tubules of the frog *Rana temporaria*. *Eur J Histochem* 59 (2): 2482.
<https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2482>
14. Dantzer WH (2016) Transport of Inorganic Ions by Renal Tubules. In: *Comparative Physiology of the Vertebrate Kidney*. Springer, NY: 81–157.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3734-9_4
15. Uchiyama M, Konno N (2006) Hormonal regulation of ion and water transport in anuran amphibians. *Gen Comp Endocrinol* 147 (1): 54–61.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.12.018>
16. Hunter M, Horisberger JD, Stanton B, Giebisch G (1987) The collecting tubule of *Amphiuma*. I. Electrophysiological characterization. *Am J Physiol Renal Physiol* 253: F1263–F1272.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1987.253.6.F1263>
17. Stoner LC, Engbretson BG, Viggiano SC, Benos DJ, Smith PR (1995) Amiloride-sensitive apical membrane sodium channels of everted *Ambystoma* collecting tubule. *J Membr Biol* 144 (2): 147–156.
<https://doi.org/10.1007/BF00232800>
18. Konno N, Hyodo S, Yamada T, Matsuda K, Uchiyama M (2007) Immunolocalization and mRNA expression of the epithelial Na⁺ channel α -subunit in the kidney and urinary bladder of the marine toad, *Bufo marinus*, under hyperosmotic conditions. *Cell Tissue Res* 328 (3): 583–594.
<https://doi.org/10.1007/s00441-007-0383-9>
19. Kumano T, Konno N, Wakasugi T, Matsuda K, Yoshizawa H, Uchiyama M (2008) Cellular localization of a putative Na⁺/H⁺ exchanger 3 during ontogeny in the pronephros and mesonephros of the Japanese black salamander (*Hynobius nigrescens* Stejneger). *Cell Tissue Res* 331: 675–685.
<https://doi.org/10.1007/s00441-007-0544-x>
20. Schmieder S, Lindenthal S, Ehrenfeld J (2002) Cloning and characterisation of amphibian ClC-3 and ClC-5 chloride channels. *Biochim Biophys Acta* 1566 (1–2): 55–66.
[https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(02\)00594-1](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00594-1)
21. Jentsch TJ (2015) Discovery of CLC transport proteins: cloning, structure, function, and pathophysiology. *J Physiol* 593 (18): 4091–4109.
<https://doi.org/10.1113/JP270043>
22. Günter W, Lüchow A, Cluzeaud F, Vandewalle A, Jentsch TJ (1998) ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (14): 8075–8080.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8075>
23. Schwake M, Friedrich T, Jentsch TJ (2001) An internalization signal in ClC-5, an endosomal Cl-channel mutated in Dent's disease. *J Biol Chem* 276 (15): 12049–12054.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M010642200>
24. Christensen EI, Devuyst O, Dom G, Nielsen R, Van der Smitten P, Verroust P, Leruth M, Guggino WB, Courtoy PJ (2003) Loss of chloride channel ClC-5 impairs endocytosis by defective trafficking of megalin and cubilin in kidney proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (14): 8472–8477.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1432873100>
25. Ferreira HG, Jesus CH (1973) Salt adaptation in *Bufo bufo*. *J Physiol* 228 (3): 583–600.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010101>
26. Katz U (1989) Strategies of adaptation to osmotic stress in anuran Amphibia under salt and burrowing conditions. *Comp Biochem Physiol A* 93 (3): 499–503.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(89\)90001-7](https://doi.org/10.1016/0300-9629(89)90001-7)
27. Scheer BT, Mumbach MW (1982) Fluxes of sodium ion in frogs (*Rana esculenta*) acclimated to solutions of NaCl in lake water and effects of hypophysectomy. *Comp Biochem Physiol* 72A (3): 549–558.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(82\)90121-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(82)90121-9)
28. Pang PKT (1977) Osmoregulatory functions of neurohypophysial hormones in fishes and amphibians. *Amer Zool* 17: 739–749.
<https://doi.org/10.1093/icb/17.4.739>
29. Nouwen EJ, Kühn ER (1985) Volumetric control of arginine vasotocin and mesotocin release in the frog (*Rana ridibunda*). *J Endocrinol* 105 (3): 371–377.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1050371>
30. Muir TJ, Costanzo JP, Lee RE Jr (2007) Osmotic and metabolic responses to dehydration and urea-loading in a dormant, terrestrially hibernating frog. *J Comp Physiol B* 177 (8): 917–926.
<https://doi.org/10.1007/s00360-007-0190-3>
31. Prutskova NP, Seliverstova EV, Kutina AV (2023) Effect of changes in water-salt balance on ion- and osmoregulatory renal functions in the lake frog. *Lab Animal Sci* 3: 44–53.
<https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-03-03>
32. Gburek J, Birn H, Verroust PJ, Goj B, Jacobsen C, Moestrup SK, Willnow TE, Christensen EI (2003) Renal uptake of myoglobin is mediated by the endocytic receptors megalin and cubilin. *Am J Physiol Renal Physiol* 285 (3): F451–F458.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00062>

33. Lee D, Gleich K, Fraser SA, Katerelos M, Mount PF, Power DA (2013) Limited capacity of proximal tubular proteolysis in mice with proteinuria. *Am J Physiol Renal Physiol* 304: F1009–F1019.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00601.2012>
34. Schnermann J, Wahl M, Liebau G, Fischbach H (1968) Balance between tubular flow rate and net fluid reabsorption in the proximal convolution of the rat kidney. I. Dependency of reabsorptive net fluid flux upon proximal tubular surface area at spontaneous variations of filtration rate. *Pflügers Arch* 304: 90–103.
<https://doi.org/10.1007/BF00586722>
35. Maack T, Johnson V, Kau ST, Figueiredo J, Sigulem D (1979) Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular-weight proteins: a review. *Kidney Int* 16: 251–270.
<https://doi.org/10.1038/ki.1979.128>
36. Cojocel C, Maita K, Baumann K, Hook JB (1984) Renal processing of low molecular weight proteins. *Pflügers Arch* 401 (4): 333–339.
<https://doi.org/10.1007/bf00584332>
37. Lazzara MJ, Deen WM (2007) Model of albumin reabsorption in the proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 292 (1): F430–F439.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00010.2006>
38. Smithies O (2003) Why the kidney glomerulus does not clog: A gel permeation/diffusion hypothesis of renal function. *PNAS* 100: 4108–4113.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0730776100>
39. Prutskova NP, Seliverstova EV (2011) Tubular GFP uptake pattern in the rat and frog kidneys. *Comp Biochem Physiol A* 160: 175–183.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.05.029>
40. Pohl M, Shan Q, Petsch T, Styp-Rekowska B, Matthey P, Bleich M, Bachmann S, Theilig F (2015) Short-term functional adaptation of aquaporin-1 surface expression in the proximal tubule, a component of glomerulotubular balance. *J Am Soc Nephrol* 26: 1269–1278.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2014020148>
41. Günter W, Piwon N, Jentsch TJ (2003) The CIC-5 chloride channel knock-out mouse – an animal model for Dent's disease. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 445: 456–462.
<https://doi.org/10.1007/s00424-002-0950-6>
42. Sakamoto H, Sado Y, Naito I, Kwon TH, Inoue S, Endo K, Kawasaki M, Uchida S, Nielsen S, Sasaki S, Marumo F (1999) Cellular and subcellular immunolocalization of CIC-5 channel in mouse kidney: Colocalization with H⁺-ATPase. *Am J Physiol* 277 (6): F957–F965.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1999.277.6.F957>
43. Wartosch L, Fuhrmann JC, Schweizer M, Stauber T, Jentsch TJ (2009) Lysosomal degradation of endocytosed proteins depends on the chloride transport protein CIC-7. *FASEB J* 23 (12): 4056–4068.
<https://doi.org/10.1096/fj.09–130880>
44. Stauber T, Jentsch TJ (2013) Chloride in vesicular trafficking and function. *Annu Rev Physiol* 75: 453–477.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212–183702>
45. Novarino G, Weinert S, Rickheit G, Jentsch TJ (2010) Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis. *Science* 328 (5984): 1398–1401.
<https://doi.org/10.1126/science.1188070>

EFFECT OF HYPERNATREMIA ON PROTEIN REABSORPTION IN RENAL PROXIMAL TUBULES OF THE LAKE FROG *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*

N. P. Prutskova[#] and E. V. Seliverstova

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St.-Petersburg, Russia

[#] *e-mail: natprut@yandex.ru*

Protein reabsorption in the kidney proximal tubules occurs simultaneously with the transport of ions and water, but little is known about the dependence of receptor-mediated protein endocytosis on water-salt balance changes. The aim of the study was to investigate tubular reabsorption and intracellular vesicular transport of various proteins in a model of hypernatremia in lake frogs (*Pelophylax ridibundus*). Frogs were injected with hypertonic sodium chloride solution (0.75 M NaCl) 1 hour before injection of green or yellow fluorescent proteins (GFP or YFP), as well as lysozyme. The method of fluorescent immunohistochemistry was used for detection of lysozyme and endocytic receptor megalin in kidney sections. Specimens were investigated using laser scanning confocal microscopy. The intensity of fluorescent signals of proteins and megalin in proximal tubular cells was determined on the images obtained. To study the dynamics of endocytosis, an automated method for quantifying colocalized protein and megalin signals was used. A statistically significant decrease in the reabsorption of GFP, YFP and lysozyme in the proximal tubules after 0.75 M of NaCl injection was found. The accumulation of proteins in the early endocytic compartment and decrease in their entry into late endosomes and lysosomes are shown, that is considered as evidence of a delay in intracellular vesicular transport in hypernatremia. The data obtained were analyzed in connection with changes in blood parameters and kidney activity during osmoregulation, and also with the role of chloride channels in receptor-mediated protein endocytosis. It can be assumed that increased ion transport in the proximal tubules cells in hypernatremia leads to decreased reabsorption capacity of epitheliocytes and delayed intracellular transport of proteins.

Keywords: amphibians, lysozyme, megalin, proximal tubule, protein reabsorption, fluorescent protein, chloride channel