

Влияние изменений водно-солевого баланса на ионо- и осморегулирующую функции почек у озерной лягушки

Н.П. Пруцкова*, Е.В. Селивёрстова, А.В. Кутина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: natprut@yandex.ru

Резюме. У озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*) анализировали изменения водно-солевого баланса и экскреции ионов почками при обезвоживании и инъекциях гипертонического и изотонического растворов NaCl. Введение 0,75 М NaCl и обезвоживание в течение 1 ч увеличивали осмоляльность сыворотки крови и концентрацию Na⁺ и Cl⁻, инъекции изотонического раствора не влияли на эти показатели. Примененные воздействия повышали содержание в моче Na⁺ и Cl⁻, а также усиливали экскрецию этих ионов. Наибольшие изменения, включая рост уровня натрия в крови, увеличение диуреза и скорости клубочковой фильтрации, установлены при введении 0,75 М NaCl. В проксимальных канальцах почек обнаружены изменения паттерна хлоридного канала ClC-5, предположительно вовлеченного в процесс эндоцитоза белка. С помощью иммуногистохимии и конфокальной микроскопии установлено увеличение числа ClC-5-иммунопозитивных профилей канальцев и интенсивности флуоресцентного сигнала в апикальной цитоплазме эпителиоцитов. Полученные результаты физиологических и иммуногистохимических исследований открывают перспективы моделирования состояний гипернатриемии, гиперволемии и обезвоживания у лягушек для изучения роли молекулярных детерминант эпителиального транспорта ионов и белков в почечных канальцах *in vivo*.

Ключевые слова: амфибии, водно-солевой баланс, почки, проксимальный каналец, хлоридный канал

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00967-23-00. Исследования методом конфокальной микроскопии проведены на базе Центра коллективного пользования ИЭФБ РАН.

Для цитирования: Пруцкова Н.П., Селивёрстова Е.В., Кутина А.В. Влияние изменений водно-солевого баланса на ионо- и осморегулирующую функции почек у озерной лягушки. Лабораторные животные для научных исследований. 2023; 3. 44–53. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-03-03>.

Original article

Effect of changes in water-salt balance on ion- and osmoregulatory renal functions in the lake frog

N.P. Prutskova*, E.V. Seliverstova, A.V. Kutina

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russian Federation

*E-mail: natprut@yandex.ru

Abstract. Changes in the water-salt balance and excretion of ions by the kidney after subcutaneous injections of hypertonic and isotonic NaCl solutions and dehydration were analyzed in lake frogs (*Pelophylax ridibundus*). The introduction of 0,75 M NaCl and dehydration for 1 hour increased the serum osmolality and Na⁺ and Cl⁻ concentrations, and injections of isotonic solution did not affect these parameters. The applied treatments increased the level of Na⁺ and Cl⁻ in the urine, and renal excretion of these ions. The most pronounced changes, including an increase in diuresis and glomerular filtration rate, were found after 0,75 M NaCl injection. In renal proximal tubules, changes in the pattern of the chloride channel (ClC-5), presumably involved in the process of protein endocytosis, were detected. An increase in the number of ClC-5-immunopositive tubule profiles and the inten-

© Пруцкова Н.П., Селивёрстова Е.В., Кутина А.В., 2023

sity of the fluorescent signal in the apical cytoplasm of epithelial cells were revealed by immunohistochemistry and confocal microscopy. Studied effects of hypernatremia, hypervolemia and dehydration may be useful for further investigations of kidney function and mechanisms of epithelial tubular transport in frog models.

Keywords: amphibians, water-salt balance, kidney, proximal tubule, chloride channel

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of state assignment No. 075-00967-23-00. Investigations by confocal microscopy were carried out on the basis of the Center for Collective Use of Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences.

For citation: Prutskova N.P., Seliverstova E.V., Kutina A.V. Effect of changes in water-salt balance on ion- and osmoregulatory renal functions in the lake frog. *Laboratory Animals for Science*. 2023; 3. 44–53. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-03-03>.

Введение

Интерес к физиологии амфибий в значительной мере связан с ключевой позицией этих животных в эволюции наземных позвоночных, разнообразием видов и мест обитания, а также с наличием широкого спектра морфологических и физиологических приспособлений, обеспечивающих выживание земноводных в изменяющихся или экстремальных условиях окружающей среды. В то же время механизмы гомеостатической регуляции водно-солевого и кислотно-щелочного баланса внутренней среды, а также транспорта воды и ионов в специализированных эпителиях осморегуляторных органов во многом аналогичны таковым у млекопитающих. Амфибии являются одними из наиболее удобных и успешно используемых экспериментальных моделей для изучения деятельности различных органов и физиологических систем позвоночных, включая экологические, молекулярно-биологические и биомедицинские исследования, а также вопросы эволюции почек позвоночных и механизмов эпителиального канальцевого транспорта [1–3].

Почка амфибий является важнейшим органом, обеспечивающим поддержание водно-солевого баланса, 20–30% профильтрованного Na^+ и Cl^- реабсорбируется в проксимальных канальцах и более 50% — в дистальных [2]. В перемещении основных осмотически активных ионов (Na^+ , Cl^-) участвуют различные транспортные белки, включая натриевые и хлоридные каналы, котранспортеры, ионные насосы и обменники [4–8]. Физиологическое значение многих из них в почках амфибий остается неясным. Электрогенный механизм транспорта Na^+ имеется в дистальных отделах нефрона и собирательных трубках, что показано в экспериментах *in vitro* для жабы-аги (*Bufo marinus*) [9], хвостатых амфибий амфиум (*Amphiuma*) [10] и амбистом (*Ambystoma*) [11]. С помощью иммуногистохимического метода установлены распределение и локализация эпителиального натриевого канала (ENaC) в эпителиальных клетках связующего канальца и главных клетках собирательных трубок у *B. marinus*, в том числе при гиперосмотическом стрессе [9].

Важная роль в реализации эпителиального транспорта веществ принадлежит белкам се-

мейства хлоридных каналов (ClC). Они представляют собой потенциалзависимые хлоридные каналы плазматической мембраны и внутриклеточные Cl^-/H^+ -обменники, вовлеченные, в частности, в трансэпителиальный транспорт и эндоцитоз [12]. В проксимальном канальце в отличие от других частей нефрона одновременно с реабсорбцией воды и ионов происходит всасывание низкомолекулярных белков с помощью рецепторов эндоцитоза мегалина и кубилина, что показано у млекопитающих [13], рыб [14] и амфибий [15–17]. Внутриклеточные хлоридные каналы, ClC-3 и ClC-5 участвуют в установлении pH различных внутриклеточных компартментов в процессе эндоцитоза, от их вовлечения в ацидофикацию эндоцитозных везикул зависит эффективность гидролиза белка в лизосомах [4, 12, 18]. В почках млекопитающих ClC-5 можно обнаружить в мембране щеточной каемки эпителиоцитов проксимального канальца, однако основная его часть локализуется в апикальных эндосомах [18, 19] наряду с ClC-3 [20]. Дефицит ClC-5 при болезни Дента и у нокаутных мышей ингибировал эндоцитоз профильтровавшихся белков в клетках проксимальных канальцев [21], однако нокаут ClC-3 не приводил к нарушению эндоцитоза в почках [22]. Некоторые гомологи хлоридных каналов амфибий клонированы (см. [5]). Два из них, хClC-3 и хClC-5, идентифицированы у лягушек рода *Xenopus* как ортологи ClC-3 и ClC-5 млекопитающих и человека с идентичностью последовательностей от 78 до 90%, при этом показана функциональная экспрессия различных ортологов ClC-5 в ооцитах *Xenopus* или в клеточных линиях млекопитающих.

Изменения осмотического баланса у амфибий в большинстве работ изучались в условиях длительной адаптации животных к повышенной солености среды или обезвоживанию в течение нескольких часов, дней или недель. Хорошо известно, что в почках амфибий нет пельте Генле, и эти животные не способны продуцировать мочу, гиперосмотическую по отношению к плазме крови, а в условиях гидратации выделяют значительное количество сильно разбавленной мочи. Однако при интенсивном обезвоживании амфибии могут вырабатывать почти изотоническую мочу и быстро реагировать на резкие изменения окружающей среды

(высыхание, повышение солености), тем самым обеспечивая кардинальное изменение в крови концентраций Na^+ , Cl^- и мочевины [7]. Показано, что содержание электролитов в крови и моче, а также осмоляльность увеличивались пропорционально длительности адаптации к солености наружной среды и концентрации в ней Na^+ , продолжительности дегидратации, снижению содержания воды в организме в процессе ее испарения с поверхности тела [23–27].

Значительно меньше сведений об изменениях параметров крови и мочи у амфибий в ответ на быстрые изменения водно-солевого баланса, вызванные парентеральным введением гипертонических и изотонических растворов. У лопатонога (*Scaphiopus couchi*) инъекции гипертонического раствора NaCl не приводили к существенному повышению осмоляльности плазмы крови [28] при наличии реакции поиска воды и ее всасывания через кожу брюшка. Внутривенные инъекции озерным лягушкам 0,3 мл раствора Рингера, содержащего NaCl (концентрация 6%), или 1 мл изотонического раствора Рингера приводили к сходному увеличению осмоляльности мочи (до 60–80 мОсм/кг H_2O) [26]. Инфузия 5% раствора соли постепенно увеличивала осмоляльность плазмы крови (до 240 мОсм/кг H_2O) у лягушки-быка (*Rana catesbeiana*) [29]. Подкожное введение изотонического раствора лесным лягушкам (*Rana silvatica*) повышало осмоляльность мочи при значительной вариабельности осмоляльности плазмы крови и содержания в ней Na^+ и Cl^- [27].

Цель работы — сравнительный анализ воздействия однократных инъекций гипертонических и гипотонических растворов, а также обезвоживания на водно-солевой гомеостаз и экскрецию ионов почками у озерных лягушек.

Задачи исследования: 1) определить осмоляльность и содержание отдельных ионов в моче и крови после примененных воздействий с последующей оценкой функциональных показателей деятельности почек клиренсовыми методами; 2) выявить с помощью иммуногистохимии и конфокальной микроскопии наличие ClC-5 в проксимальных канальцах нефронов и возможные изменения паттерна этого канала при наиболее эффективных воздействиях на ионорегулирующую функцию почек.

Материал и методы

Животные. В опытах использовали озерных лягушек, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), прежнее название *Rana ridibunda*, отловленных в Астраханской области, со средней массой тела 102 ± 3 г ($n=66$), преимущественно самцов ($n=50$). До экспериментов, проводимых с ноября по 1-ю половину апреля 2022 г., зимующих лягушек содержали в холодильной камере вивария института при температуре 4°C в пластиковых контейнерах с фильтрованной водопроводной водой, сменяемой через день,

без кормления, поскольку в периоде гибернации лягушки не питаются. Исследование выполнено с соблюдением принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986), содержание животных и методы исследования одобрены комиссией по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол № 11–1/2022 от 24.11.22).

Экспериментальные процедуры. Животных, адаптированных к комнатной температуре в течение 1 ч, помещали в индивидуальные контейнеры, заполненные водопроводной водой (23°C) до уровня 1–2 см. В начале опыта у гидратированных лягушек добивались опорожнения мочевого пузыря путем мягкого надавливания на переднюю брюшную стенку. После этого животное взвешивали на электронных лабораторных весах ВЛТЭ-210/510 (Госметр, Россия) для расчета доз вводимых веществ и функциональных показателей работы почек. Все инъекции осуществляли подкожно в спинной лимфатический мешок, используя шприц с иглой 27G. Для моделирования изменений водно-солевого баланса проводили следующие серии экспериментов: 1) инъекции 0,75 М NaCl в дозе 100 мкл на 30 г массы тела, контрольным животным вводили такое же количество изотонического 0,01 М фосфатно-солевого буфера (PBS); 2) гиперволемию, создаваемая введением изотонического PBS в объеме 0,9 мл на 30 г массы тела (3% от массы тела), в контроле использовали PBS, 100 мкл на 30 г массы; 3) дегидратация путем помещения животного в сухой контейнер в сравнении с оптимальной гидратацией в контроле. Для сбора мочи контрольным и опытным животным накладывали кисетный шов на кожу промежности вокруг анального отверстия и перевязывали клоаку. Лигатуру снимали через 1 ч и собирали мочу при произвольном мочеиспускании, регистрировали объем пробы. После сбора мочи лягушкам вводили зеленый флуоресцентный белок (GFP) (Институт белка, РАН, Пушкино-на-Оке, Россия) для тестирования канальцевой реабсорбции. Через 20 мин лягушек обездвигивали с целью обезболивания, разрушая спинной мозг с помощью препаровальной иглы, затем собирали кровь из сердца, быстро извлекали почки и проводили эвтаназию путем декапитации. У части животных (по 3–4 лягушки из каждой серии) перевязку клоаки и сбор проб мочи и крови не проводили, а через 1 ч после воздействий и в контроле вводили лизоцим (Sigma Aldrich Inc., США). Через 20 мин лягушек обездвигивали, извлекали почки и проводили эвтаназию. Вводимые вещества (NaCl , а также белки в дозе 18 мкг/100 мкл на 30 г массы тела) растворяли на PBS, осмоляльность 200 мОсм/кг H_2O , pH 7,4.

Измерения и расчеты. Осмоляльность мочи и сыворотки крови определяли криоскопическим методом (в мОсм/кг H_2O) на микроосмометре Osmo 1 (Advanced Instruments,

США). Концентрацию натрия и калия в пробах мочи измеряли на пламенном фотометре Sherwood-420 (Sherwood Scientific, Великобритания), а в сыворотке крови — с помощью ионоселективного блока на автоматическом биохимическом анализаторе Erba XL-200 (Lachema, Чехия). На этом же анализаторе в пробах мочи и сыворотки крови определяли концентрацию Cl^- (ионоселективным методом), креатинина (кинетическим методом по реакции Яффе) с использованием готовых реактивов и сывороток фирмы Erba (Чехия). Были рассчитаны функциональные показатели, характеризующие работу почек, в том числе диурез (V , мл/мин) и экскреция отдельных ионов [концентрация каждого из ионов в моче (UNa , etc.), умноженная на V]. Для оценки скорости клубочковой фильтрации (СКФ) использовали клиренс креатинина (C_{cr}), определяемый как отношение содержания креатинина в моче и сыворотке крови (U_{cr}/P_{cr}), умноженное на V . Все показатели (в соответствующих единицах) подсчитывали на 100 г массы тела.

Морфологические исследования. Образцы ткани почек фиксировали в 4% растворе параформальдегида с последующим отмыванием, криопротекцией и замораживанием в жидком азоте согласно применяемому ранее протоколу [16]. Срезы (толщиной 5–7 мкм) из разных частей почки готовили в криостате CM 1510 (Leica Microsystems, Германия). В иммуногистохимических исследованиях применяли поликлональные кроличьи антитела к ClC-5 (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1:100, моноклональные мышинные антитела к мегалину/LRP2 (MyBioSource, США; Acris, Origene Technologies, США) в разведении 1:1000, а также флуоресцентные конъюгаты козьих антикроличьих и антимышиных иммуноглобулинов (IgGs) с Alexa Fluor 488 и 568 (Invitrogen, Molecular Probes, США) по описанной ранее процедуре [16]. 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 с увеличением в 40 раз. В режиме лазерного сканирования использовали спектры возбуждения с длиной волны 488 и 568 нм, регистрируя свечение в зеленой (500–520 нм) и красной (590–650 нм) частях спектра соответственно. Изображения, полученные при идентичных и постоянных параметрах работы микроскопа, анализировали, пользуясь программой Image J. На изображениях надгломмерулярной зоны подсчитывали относительное число профилей иммунопозитивных проксимальных канальцев (в процентах к общему числу визуализированных проксимальных канальцев). В эпителиальном слое иммунопозитивных канальцев определяли интенсивность флуоресцентного сигнала (оптическая плотность, усл. ед.) в апикальной области эпителиоцитов.

Статистика. Для количественной оценки результатов применяли методы параметрической и непараметрической статистики. В случае соответствия показателей закону нормального распределения по результатам теста Шапиро–Уилка данные представляли в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm SEM$), сравнения проводили с использованием непарного t -теста Стьюдента. Другие данные представляли как медиану с верхним и нижним квартилями [$Me (Q1; Q3)$], для сравнения независимых групп использовали U - или T -критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для расчетов и статистической обработки данных пользовались программой Microsoft Office Excel 2010 и онлайн-калькуляторами.

Результаты и обсуждение

Измеренные у озерных лягушек показатели крови в контрольных сериях опытов были весьма стабильными, а существенные изменения установлены после инъекции гипертонического раствора или обезвоживания (табл. 1). Инъекция 0,75 М NaCl привела к достоверному увеличению концентрации Na^+ и Cl^- в крови и некоторому росту осмоляльности. При дегидратации увеличилась осмоляльность и концентрация Na^+ и K^+ крови, а после инъекций изотонического раствора все измеренные показатели не отличались от контроля. Концентрация измеренных ионов и осмоляльность мочи в контрольных условиях были низкими, что типично для полностью гидратированных амфибий. Наибольшая реакция почек была выявлена в ответ на инъекции NaCl, выражавшаяся в существенном повышении осмоляльности и концентрации Na^+ и Cl^- в моче (табл. 2). При этом установлено статистически значимое повышение минутного диуреза и клиренса креатинина (табл. 3). В условиях дегидратации и гиперволемии увеличилось только содержание в моче Na^+ и Cl^- при неизменной величине диуреза и СКФ. В то же время при анализе ионорегулирующей функции почек установлено усиление экскреции Na^+ и Cl^- в результате всех примененных воздействий (см. табл. 3).

Показатели, измеренные в наших контрольных опытах у гидратированных озерных лягушек, были в пределах или ниже установленных ранее в сыворотке или плазме крови у отдельных видов бесхвостых амфибий. Так, у разных лягушек и жаб (*Rana ridibunda*, *Rana temporaria*, *Bufo bufo*, *B. marinus*) средние значения осмоляльности крови находились в диапазоне 180–240 мОсм/кг H_2O [23, 25, 30, 31]. Более высокие значения (247–275 мОсм/кг H_2O) приводятся для некоторых видов из южных мест обитания. К ним относятся *R. ridibunda* из Турции [32] и северного Израиля [33], *R. silvatica* из южного Огайо (США) [27], а также *S. couchi*, пустынная жаба из национального заповедника в Буэнос-

Таблица 1.
Осмоляльность сыворотки крови и концентрация ионов натрия, калия и хлора у озерных лягушек при изменении водно-солевого баланса

Серия опыта	Показатель крови ($M \pm SEM$)							
	P_{Osm}^* мОсм/кг H_2O	n	P_{Na}^* мМ	n	P_K^* мМ	n	P_{Cl}^* мМ	n
Инъекция 0,75 М NaCl	208±5	10	101±3*	10	4,1±0,3	10	70±3*	10
Контроль	197±4	10	94±2	10	4,7±0,5	10	60±3	10
Дегидратация	212±3*	11	106±2**	10	3,7±0,3*	10	66±3	10
Контроль	199±4	13	96±2	13	4,8±0,3	12	63±2	13
Гиперволемиа	193±8	10	93±5	8	5,3±0,4	8	62±3	8
Контроль	196±7	9	96±3	9	4,6±0,4	9	64±3	9

Примечание. Достоверность различий: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ по сравнению с контролем (t-тест Стьюдента).

Таблица 2.
Показатели мочи у озерных лягушек при различных воздействиях

Серия опыта	Показатель мочи, Ме (Q1; Q3)							
	U_{Osm}^* мОсм/кг H_2O	n	U_{Na}^* мМ	n	U_K^* мМ	n	U_{Cl}^* мМ	n
Инъекция 0,75 М NaCl	47 (44; 66)**	6	13,3 (11,9; 15,7)*	6	1,5 (1,2; 2,3)	6	8,7 (4,2; 13,0)**	6
Контроль	22 (17; 33)	9	3,8 (1,8; 5,6)	8	1,2 (0,8; 1,5)	9	0,5 (0,01; 1,2)	8
Дегидратация	39 (23; 52)	8	8,6 (3,5; 16,8)*	8	1,7 (0,9; 2,2)	8	5,6 (3,0; 6,4)**	6
Контроль	29 (26; 39)	9	0,01 (0,01; 4,2)	7	1,2 (0,9; 2,4)	10	0,9 (0,01; 1,5)	7
Гиперволемиа	28 (22; 60)	7	6,6 (3,3; 19,5)**	7	0,6 (0,6; 1,4)	7	3,9 (0,8; 16,7)*	7
Контроль	32 (28; 40)	8	0,01 (0,01; 3,6)	6	1,2 (0,9; 2,4)	9	0,01 (0,01; 3,0)	7

Примечание. Достоверность различий: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем (U-критерий Манна–Уитни).

Таблица 3.
Показатели диуреза, скорости клубочковой фильтрации и экскреции ионов в почках озерных лягушек в различных сериях опытов

Серия опыта	Диурез, мкл/мин на 100 г массы ($M \pm SEM$)		Клиренс креатинина, мкл/мин на 100 г массы ($M \pm SEM$)		Экскреция ионов, нмоль/мин на 100 г массы тела, Ме (Q1; Q3)					
	V	n	C_{Cr}	n	$U_{Na}V$	n	U_KV	n	$U_{Cl}V$	n
Инъекция 0,75 М NaCl	16±5 [#]	6	19±6 [#]	6	222 (99; 319)**	6	19 (18; 28)*	6	75 (40; 196)***	6
Контроль	7±2	9	8±2	7	37 (20; 53)	8	7 (6; 9)	8	4 (0,1; 15)	8
Дегидратация	11±2	7	11±3	7	94 (34; 168)*	8	11 (7; 30)	8	59 (24; 69)*	6
Контроль	9±3	6	10±3	6	0,2 (0,1; 59)	7	13 (7; 20)	9	11 (0,2; 20)	7
Гиперволемиа	7±3	5	9±3	5	106 (24; 143)*	7	7 (4; 10)	7	65 (27; 84)*	6
Контроль	8±3	5	9±3	5	0,2 (0,1; 43)	6	12 (7; 16)	8	6 (0,1; 22)	6

Примечание. Достоверность различий по сравнению с контролем: [#] $p < 0,05$ (t-тест Стьюдента); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (U-критерий Манна–Уитни).

Айресе [34]. Измеренная концентрация Na^+ в крови у *P. ridibundus* оказалась сходной с таковой у *B. marinus* [30], съедобной лягушки *Rana esculenta* [24] и *R. temporaria* [31] — около 100 мМ. Это несколько ниже, чем у *B. bufo* [23], *R. ridibunda* [33], *R. catesbeiana* [35] и леопардовой лягушки *Rana pipiens* [24] — 117, 115, 116–121 и 133 мМ соответственно. Концентрация Cl^- в крови у *P. ridibundus* была такой же, как у *R. silvatica* [27]. Более высокие значения (78–116 мМ) приводятся для *R. catesbeiana* [35], *B. bufo* [23] и зеленой жабы *B. viridis* [26].

Осмоляльность крови является строго регулируемым параметром ввиду направленности механизмов гомеостатической регуляции на стабилизацию объема клеток при изменении осмоляльности окружающей среды [3]. У разных видов амфибий различия в осмоляльности крови и содержании в ней натрия как основного иона могут быть обусловлены множеством факторов, а спектр адаптаций амфибий к повышенной солености среды, согласно недавнему обзору, значительно шире, чем полагали ранее [36]. В среде с повышенной соленостью у амфибий повышается концентрация Na^+ и Cl^- в плазме крови, снижаются выработка мочи и транспорт Na^+ в коже [37]. Отмечена связь между осмоляльностью плазмы крови в норме и способностью амфибий выдерживать осмотический стресс, что происходит за счет увеличения в крови концентрации мочевины [26]. Так, некоторые наземные и полуводные виды амфибий могли адаптироваться к высокой солености среды (400 мМ NaCl) или длительному обезвоживанию (крайняя лягушка *R. cancrivora*, а также жабы *B. viridis* и *S. couchi*). В контроле они имели более высокую осмоляльность плазмы крови (270–305 мОсм/кг H_2O) и концентрацию мочевины по сравнению с плохо адаптирующимися видами, выживающими только в среде с умеренной соленостью (130–200 мМ NaCl). К последним относится большинство бесхвостых амфибий, включая озерных лягушек, у которых, согласно нашим опытам, осмоляльность крови в норме в среднем не превышала 200 мОсм/кг H_2O .

Было продемонстрировано, что организм зимующих озерных лягушек способен реагировать на рост уровня натрия в крови, вызванный инъекцией 0,75 М NaCl, повышением осмоляльности мочи, усилением диуреза и экскреции Na^+ и Cl^- почками. У летних озерных лягушек при внутривенном введении раствора Рингера, содержащего NaCl в концентрации 6%, отмечены аналогичные изменения осмоляльности мочи [25]. Внутривенное введение 0,5–1,0 М NaCl лопатоногам незначительно повышало осмоляльность крови [28] как при введении 0,75 М NaCl в наших опытах. При длительной дегидратации (23 дня), приводившей к уменьшению содержания воды в организме *R. silvatica* на 10% относительно влажной массы тела, осмоляльность и концентрация Na^+ и Cl^-

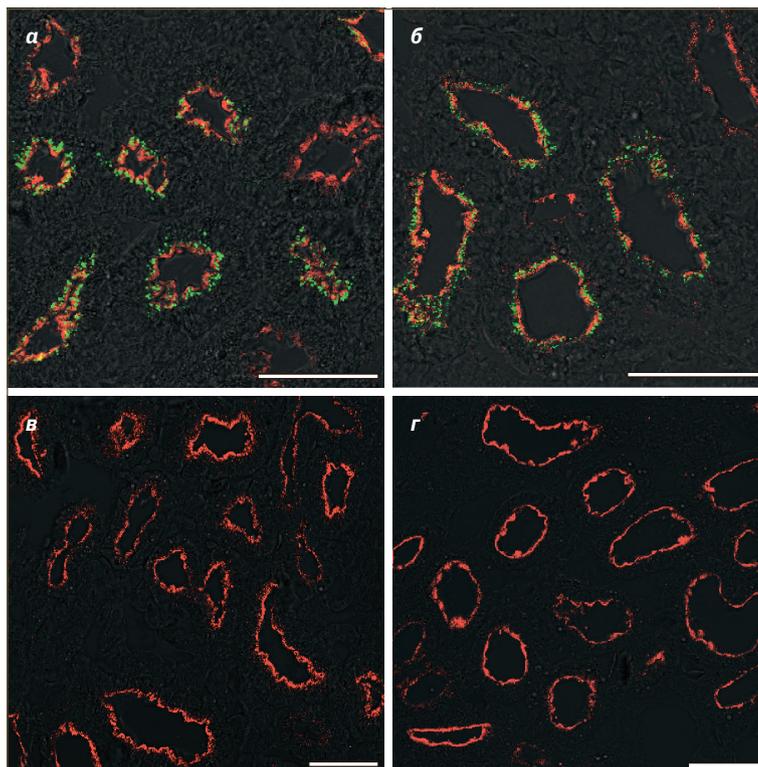


Рис. 1. Иммуногистохимическая детекция мегалина в почках озерной лягушки. Сходство в распределении сигнала мегалина (красный цвет) в проксимальных канальцах в контроле (а, в) и после инъекции 0,75 М NaCl (б, г). Совмещенные изображения, 20 мин после введения GFP (а, б) и лизоцима (в, г). Реабсорбция GFP (зеленый цвет) в большинстве мегалин-позитивных профилей канальцев (а, б), колокализация мегалина и GFP (желтый цвет). Калибровка: 50 мкм

в плазме возрастали в 1,5 раза [27]. В наших опытах показано, что даже кратковременное обезвоживание (1 ч) у озерной лягушки приводило к достоверному увеличению осмоляльности и концентрации Na^+ в сыворотке крови, хотя у лягушки-быка для повышения осмоляльности плазмы требовалось не менее 1,5–2,5 ч обезвоживания [29]. При дегидратации в отличие от инъекций NaCl также отмечено снижение концентрации K^+ крови, по-видимому, за счет поступления этого иона в клетки, поскольку его экскреция с мочой не увеличивалась. При гиперволемии показатели крови не изменялись, однако повышалась экскреция с мочой Na^+ и Cl^- . Гиперволемия у *R. silvatica* приводила к значительной вариабельности осмоляльности плазмы крови и содержания в ней этих ионов, но повышала осмоляльность мочи [27]. Величина СКФ во всех контрольных опытах оказалась весьма стабильной (порядка 8–10 мл/мин на 100 г массы тела) и увеличивалась только после инъекций 0,75 М NaCl (см. табл. 3). В контроле и после инъекций NaCl у всех лягушек имела место реабсорбция GFP в значительном числе проксимальных канальцев. При маркировании проксимальных канальцев по мегалину хорошо видно, что GFP присутствует в большинстве мегалин-позитивных профилей канальцев (рис. 1, а, б).

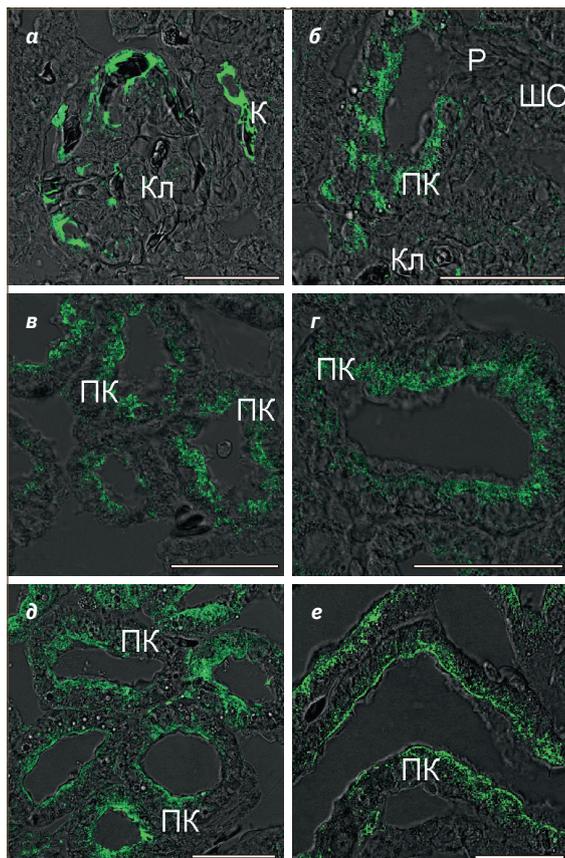


Рис. 2. Иммуногистохимическая детекция хлоридного канала ClC-5 в почках озерной лягушки. Совмещенные изображения, 20 мин после введения лизоцима. Присутствие ClC-5 (зелёный цвет) в структурах почечного клубочка (а), эпителиоцитах начального сегмента проксимального канальца (б), проксимальных канальцах супрагломерулярной зоны в контроле (в, г) и после инъекции 0,75 М NaCl (д, е). К – капилляр; Кл – почечный клубочек; ПК – проксимальный каналец; ШО – шеечный отдел нефрона; Р – реснички. Калибровка: 50 мкм

В целом статистически значимое увеличение уровня Na^+ в крови у озерной лягушки после инъекции 0,75 М NaCl и обезвоживания (101 ± 3 и 106 ± 2 мМ против 96 ± 3 мМ в контроле) находилось в пределах нормальных физиологических значений этого показателя у других видов амфибий, но было достаточным для усиления ионорегулирующей функции почек. Это побудило нас к сопоставлению паттерна ClC-5 в нефронах в контроле и после введения 0,75 М NaCl, то есть при усиленном поступлении в почечные канальцы осмотически активных веществ. Распределение ClC-5 анализировали в образцах, полученных в опытах с введением лизоцима, который в течение 20 мин после инъекции хорошо всасывается в эпителии проксимальных канальцев, что было показано ранее [16]. Присутствие в клетках мегалина как основного рецептора эндоцитоза служило важным показателем способности эпителиоцитов к захвату лизоцима, являю-

щегося известным лигандом этого рецептора. После инъекций NaCl не наблюдалось изменений как паттерна мегалина по сравнению с контролем (рис. 1, в, г), так и величины сигнала, которая составила 32,7 (30,4; 36,1) и 31,0 (29,5; 32,7) усл. ед. соответственно ($p > 0,05$; $n = 4$ в каждой группе).

Метка к ClC-5 присутствовала в структурах почечных клубочков и эпителии проксимальных канальцев. Флуоресцентный сигнал был наиболее интенсивным в сосудистой сети клубочка и околоканальцевых капиллярах (рис. 2, а). Основываясь на свидетельствах участия ClC-5 в процессе эндоцитоза белка, распределение ClC-5 анализировали главным образом в эпителии проксимальных канальцев. По ходу проксимальных канальцев иммунофлуоресценция ClC-5 выявлялась, начиная с начальных сегментов, сразу после шеечного отдела, характеризующегося наличием реснитчатого эпителия (рис. 2, б). В эпителиоцитах контрольных образцов метка распределялась преимущественно в апикальной цитоплазме (рис. 2, в), а также в субапикальной и перинуклеарной зонах (рис. 2, б, г). При визуальной оценке сигнала после инъекций NaCl отмечено усиление свечения в апикальной зоне клеток (рис. 2, д), что в отдельных канальцах имело вид яркой узкой полосы непосредственно под щеточной каемкой (рис. 2, г).

Для количественной оценки иммунофлуоресценции ClC-5 в образцах ткани почек лягушек в контроле ($n = 4$) и опыте ($n = 4$) было идентифицировано по 480 проксимальных канальцев. Отмечена тенденция к увеличению (в процентах) иммунопозитивных профилей проксимальных канальцев после инъекций NaCl – 57 (51; 63) по сравнению с 47 (42; 54) в контроле ($p > 0,05$, T -критерий Манна–Уитни). При дальнейшем анализе просмотрено 65 и 50 изображений и визуализировано 230 и 227 иммунопозитивных канальцев соответственно. Установлено увеличение интенсивности сигнала ClC-5 (в усл. ед.) в апикальной зоне эпителиальных клеток от 17,7 (15,4; 19,4) в контроле до 26,9 (23,6; 31,4) после инъекций NaCl ($p < 0,05$), а также повышение максимума свечения от 154 (123; 178) до 211 (197; 225); $p = 0,057$. Таким образом, при увеличении СКФ и усиленном поступлении в почечные канальцы осмотически активных веществ увеличивается количество ClC-5 в эпителии проксимальных канальцев. Это согласуется с наличием тесной связи между поступлением различных веществ с током жидкости в просвет почечных канальцев и последующей их реабсорбцией и транспортом в эпителиальных клетках. Ранее показано [38], что у мышей с мозаичной экспрессией ClC-5 в проксимальных канальцах происходит снижение аквапорина 1 в апикальной цитоплазме ClC-5-негативных клеток и угнетение эндоцитоза белка. Исходя из установленных изменений паттерна ClC-5 в проксималь-

ных канальцах после инъекции 0,75 М NaCl, для дальнейших исследований представляет интерес детальное изучение в этих условиях захвата и везикулярного транспорта экзогенных белков.

Заключение

В ходе проведенного сравнительного анализа эффектов однократных инъекций гипертонических и гипотонических растворов, а также обезвоживания на водно-солевой гомеостаз и экскрецию ионов почками у озерных лягушек показано, что инъекции 0,75 М NaCl озерным лягушкам оказались наиболее эффективными из примененных воздействий в отношении ионо- и осморегулирующей функций почек. Повышение концентрации Na^+ и Cl^- в крови сопровождалось усилением экскреции этих ионов с мочой и повышением экспрессии ClC-5 в проксимальных канальцах почек. Можно полагать, что дальнейшие опыты на лягушках в представленных физиологических моделях могут внести вклад в понимание функционирования молекулярных детерминант эпителиального канальцевого транспорта и эндоцитоза белка в почках при изменении водно-солевого гомеостаза.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Braun E.D., Dantzer W.H. Vertebrate renal system / In: Dantzer W.H. (ed.) Handbook of Physiology, Section 13. Comparative Physiology. Vol. I. New York: Oxford University Press, 1997. P. 481–576.
- Burggren W.W., Warburton S. Amphibians as animal models for laboratory research in physiology // *Ilar. J.* 2007. Vol. 48. N. 3. P. 260–269. DOI: 10.1093/ilar.48.3.260.
- Natochin Yu.V. Principles of evolution of the excretory organs and the system of homeostasis // *J. Evol. Biochem. Phys.* 2019. Vol. 55. N. 5. P. 398–410. DOI: 10.1134/S0022093019050077.
- Schwake M., Friedrich T., Jentsch T.J. An internalization signal in ClC-5, an endosomal Cl-channel mutated in Dent's disease // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. N. 15. P. 12049–12054. DOI: 10.1074/jbc.M010642200.
- Schmieder S., Lindenthal S., Ehrenfeld J. Cloning and characterisation of amphibian ClC-3 and ClC-5 chloride channels // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. Vol. 1566. N. 1–2. P. 55–66. DOI: 10.1016/S0005-2736(02)00594-1.
- McCormick S.D., Bradshaw D. Hormonal control of salt and water balance in vertebrates // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2006. Vol. 147. N. 1. P. 3–8. DOI: 10.1016/j.ygcn.2005.12.009.
- Uchiyama M., Konno N. Hormonal regulation of ion and water transport in anuran amphibians // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2006. Vol. 147. N. 1. P. 54–61. DOI: 10.1016/j.ygcn.2005.12.018.
- Møbjerg N., Larsen E.H., Novak I. Ion transport mechanisms in the mesonephric collecting duct system of the toad *Bufo bufo*: microelectrode recordings from isolated and perfused tubules // *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 2004. Vol. 137. N. 3. P. 585–595. DOI: 10.1016/j.cbpb.2003.11.015.
- Konno N., Hyodo S., Yamada T. et al. 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.* 2007. Vol. 328. N. 3. P. 583–594. DOI: 10.1007/s00441-007-0383-9.
- Hünter M., Horisberger J.D., Stanton B., Giebisch G. The collecting tubule of *Amphiuma*. I. Electrophysiological characterization // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 1987. Vol. 253. N. 6. P. F1263–F1272. DOI: 10.1152/ajprenal.1987.253.6.F1263.
- Stoner L.C., Engbretson B.G., Viggiano S.C. et al. Amiloride-sensitive apical membrane sodium channels of everted *Ambystoma* collecting tubule // *J. Membr. Biol.* 1995. Vol. 144. N. 2. P. 147–156. DOI: 10.1007/BF00232800.
- Jentsch T.J. Discovery of CLC transport proteins: cloning, structure, function, and pathophysiology // *J. Physiol.* 2015. Vol. 593. N. 18. P. 4091–4109. DOI: 10.1113/JP270043.
- Christensen E.I., Birn H., Storm T. et al. Endocytic receptors in the renal proximal tubule // *Physiology (Bethesda)*. 2012. Vol. 27. N. 4. P. 223–236. DOI: 10.1152/physiol.00022.2012.
- Anzenberger U., Bit-Avragim N., Rohr S. et al. Elucidation of megalin/LRP2-dependent endocytic transport processes in the larval zebrafish pronephros // *J. Cell Sci.* 2006. Vol. 119. Pt. 10. P. 2127–2137. DOI: 10.1242/jcs.02954.
- Christensen E., Raciti D., Reggiani L. et al. Gene expression analysis defines the proximal tubule as the compartment for endocytic receptor-mediated uptake in the *Xenopus* pronephric kidney // *Pflügers Arch.* 2008. Vol. 456. N. 6. P. 1163–1176. DOI: 10.1007/s00424-008-0488-3.
- Seliverstova E.V., Prutskova N.P. Receptor-mediated endocytosis of lysozyme in renal proximal tubules of the frog *Rana temporaria* // *Eur. J. Histochem.* 2015. Vol. 59. N. 2. P. 2482. DOI: 10.4081/ejh.2015.2482.
- Seliverstova E.V., Romanova I.V., Prutskova N.P. Molecular determinants of protein reabsorption in the amphibian kidneys // *Acta Histochem.* 2021. Vol. 123. N. 6. P. 151760. DOI: 10.1016/j.acthis.2021.151760.
- Günther W., Lüchow A., Cluzeaud F. et al. ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998. Vol. 95. N. 14. P. 8075–8080. DOI: 10.1073/pnas.95.14.8075.
- Wartosch L., Fuhrmann J.C., Schweizer M. et al. Lysosomal degradation of endocytosed proteins depends on the chloride transport protein ClC-7 // *FASEB J.* 2009. Vol. 23. N. 12. P. 4056–4068. DOI: 10.1096/fj.09-130880.
- Hara-Chikuma M., Yang B., Sonawane N. D. et al. ClC-3 chloride channels facilitate endosomal acidification and chloride accumulation // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. N. 2. P. 1241–1247. DOI: 10.1074/jbc.M407030200.
- Christensen E.I., Devuyst O., Dom G. et al. Loss of chloride channel ClC-5 impairs endocytosis by defective trafficking of megalin and cubilin in kidney proximal

- tubules // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2003. Vol. 100. N. 14. P. 8472–8477. DOI: 10.1073/pnas.1432873100.
22. Rickheit G., Wartosch L., Schaffer S. et al. Role of ClC-5 in renal endocytosis is unique among CLC exchangers and does not require PY-motif-dependent ubiquitylation // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285. N. 23. P. 17595–17603. DOI: 10.1074/jbc.M110.115600.
 23. Ferreira H.G., Jesus C.H. Salt adaptation in *Bufo bufo* // J. Physiol. 1973. Vol. 228. N. 3. P. 583–600. DOI: 10.1113/jphysiol.1973.sp010101.
 24. Scheer B.T., Mumbach M.W. Fluxes of sodium ion in frogs (*Rana esculenta*) acclimated to solutions of NaCl in lake water and effects of hypophysectomy // Comp. Biochem. Physiol. 1982. Vol. 72A. N. 3. P. 549–558. DOI: 10.1016/0300-9629(82)90121-9.
 25. Nouwen E.J., Kühn E.R. Volumetric control of arginine vasotocin and mesotocin release in the frog (*Rana ridibunda*) // J. Endocrinol. 1985. Vol. 105. N. 3. P. 371–377. DOI: 10.1677/joe.0.1050371.
 26. Katz U. Strategies of adaptation to osmotic stress in anuran amphibian under salt and burrowing conditions // Comp. Biochem. Physiol. 1989. Vol. 93A. N. 3. P. 499–503.
 27. Muir T.J., Costanzo J.P., Lee R.E. Jr. Osmotic and metabolic responses to dehydration and urea-loading in a dormant, terrestrially hibernating frog // J. Comp. Physiol. B. 2007. Vol. 177. N. 8. P. 917–926. DOI: 10.1007/s00360-007-0190-3.
 28. Mayer L.P., Propper C.R. Intra- and extracellular dehydration has no effect on plasma levels of angiotensin II in an amphibian // J. Exp. Zool. 2000. Vol. 286. N. 4. P. 343–349. DOI: 10.1002/(sici)1097-010x(20000301)286:4<343::aid-jez2>3.0.co;2-z.
 29. Pang P.K.T. Osmoregulatory functions of neurohypophysial hormones in fishes and amphibians // Amer. Zoologist. 1977. Vol. 17. P. 739–749.
 30. Konno N., Hyodo S., Matsuda K., Uchiyama M. Effect of osmotic stress on expression of a putative facilitative urea transporter in the kidney and urinary bladder of a marine toad, *Bufo marinus* // J. Exp. Biol. 2006. Vol. 209. Pt. 7. P. 1207–1216. DOI: 10.1242/jeb.02123.
 31. Kutina A.V., Marina A.S., Natochin Yu.V. Effects of exenatide on glycemia and renal water and ion excretion differ in frogs and rats // J. Evol. Biochem. Physiol. 2016. Vol. 52. N. 3. P. 228–237.
 32. Voituron Y., Eugene M., Barré H. Survival and metabolic responses to freezing by the water frog (*Rana ridibunda*) // J. Exp. Zool. 2003. Vol. 299. N. 2. P. 118–126. DOI: 10.1002/jez.a.10285.
 33. Katz U. NaCl adaptation in *Rana ridibunda* and a comparison with the euryhaline toad *Bufo viridis* // J. Exp. Biol. 1975. Vol. 63. N. 3. P. 763–773. DOI: 10.1242/jeb.63.3.763.
 34. Johnson W.E., Propper C.R. Effects of dehydration on plasma osmolality, thirst-related behavior, and plasma and brain angiotensin concentrations in Couch's spadefoot toad, *Scaphiopus couchii* // J. Exp. Zool. 2000. Vol. 286. N. 6. P. 572–584. DOI: 10.1002/(sici)1097-010x(20000501)286:6<572::aid-jez4>3.0.co;2-b.
 35. Coppo J.A., Mussart N.B., Fioranelli S.A. Blood and urine physiological values in farm-cultured *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae) in Argentina // Rev. Biol. Trop. 2005. Vol. 53. N. 3–4. P. 545–559. DOI: 10.15517/rbt.v53i3-4.14669.
 36. Hopkins G.R., Brodie E.D. Jr. Occurrence of amphibians in saline habitats: A review and evolutionary perspective // Herpetological Monographs. 2015. Vol. 29. P. 1–27. DOI: 10.1655/HERPMONOGRAPHS-D-14-00006.
 37. Balinsky J.B. Adaptation of nitrogen metabolism to hyperosmotic environment in Amphibia // J. Exp. Zool. 1981. Vol. 215. N. 3. P. 335–350. DOI: 10.1002/jez.1402150311.
 38. Pohl M., Shan Q., Petsch T. et al. Short-term functional adaptation of aquaporin-1 surface expression in the proximal tubule, a component of glomerulotubular balance // J. Am. Soc. Nephrol. 2015. Vol. 26. P. 1269–1278. DOI: 10.1681/ASN.2014020148.

Информация об авторах

Н.П. Пруцкова, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии почки и водно-солевого обмена, natprut@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6007-5712>

Е.В. Селивёрстова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии почки и водно-солевого обмена, <https://orcid.org/0000-0003-2096-693X>

А.В. Кутина, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией физиологии почки и водно-солевого обмена, <https://orcid.org/0000-0002-8970-9854>

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, 194223, Россия, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44.

Information about the authors

N.P. Prutskova, Doctor of Biology, Leading Researcher, natprut@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6007-5712>

E.V. Seliverstova, PhD, Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0003-2096-693X>

A.V. Kutina, PhD, Head of Laboratory of Renal Physiology, <https://orcid.org/0000-0002-8970-9854> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, 194223, Russian Federation, Saint Petersburg, Torez Av., 44.

Вклад авторов в написание статьи

Н.П. Пруцкова — концепция, дизайн и проведение экспериментов, конфокальная микроскопия, работа с изображениями, расчеты и статистический анализ данных, подготовка иллюстраций и текста публикации.

Е.В. Селивёрстова — дизайн экспериментов, сбор первичных данных, морфологические и иммуногистохимические исследования, конфокальная микроскопия, редактирование текста рукописи.

А.В. Кутина — измерения физиологических показателей, работа с табличным материалом, критический анализ полученных результатов, редактирование рукописи.

Сведения о конфликте интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дата поступления рукописи
в редакцию: 27.04.2023

Дата рецензии статьи: 24.05.2023

Дата принятия статьи к публикации: 08.08.2023

Authors contribution

N.P. Prutskova — conceptualization, design and conduct of experiments, confocal microscopy, working with images, calculations and statistical analysis of data, preparing of illustrations and text of the manuscript.

E.V. Seliverstova — design of experiments, data collection, morphological and immunohistochemical studies, confocal microscopy, editing of the text.

A.V. Kutina — measurements of physiological parameters, working with tabular material, critical analysis of the results obtained, editing of the text.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received: 27.04.2023

Reviewed: 24.05.2023

Accepted for publication: 08.08.2023
