DOI: https://doi.org/10.17816/morph.636307 EDN RXWDLP

# Морфологические особенности почек у мышей с нокаутом гена *INSRR* в условиях бикарбонатной нагрузки

Е.А Ганцова[1,2], О.В. Серова[3], И.Е. Деев[3], А.В. Ельчанинов[1,2,4], Т.Х. Фатхудинов[1,2,4]

[1]Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Россия;
[2]Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва, Россия;
[3]Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;
[4]Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

**Обоснование.** Рецепторная тирозинкиназа, подобная рецептору инсулина (IRR), функционирует как сенсор внеклеточного щелочного pH и участвует в выделении бикарбоната почками. Высокая экспрессия IRR выявлена в β-интеркалирующих клетках почек, расположенных в дистальных канальцах, где происходит секреция бикарбоната. Для создания новой модели, позволяющей изучать чувствительность к изменениям pH, была выведена уникальная линия мышей с инактивированным геном *INSRR* на основе линии C57BL/6.

**Цель исследования** — проанализировать морфологические изменения тканей почек у мышей с нокаутом гена *INSRR* в сравнении с животными дикого типа в нормальных условиях и при метаболическом алкалозе.

**Методы.** В работе использовали мышей потомков одного поколения (литтермейтс), генотип которых подтверждали методом полимеразной цепной реакции. В эксперименте использовали 2 линии мышей — нокаутные по гену *INSRR* и дикий тип, в двух условиях — нормальные условия и экспериментальный алкалоз. Для морфометрического анализа проводили обзорное окрашивание криосрезов почек гематоксилином и эозином. Количество макрофагов в почках оценивали методом иммуногистохимического окрашивания.

**Результаты.** Морфометрический анализ показал, что нокаут гена *INSRR* не вызывает серьёзных патологических изменений в структуре почек. Однако были обнаружены значимые различия в толщине паренхимы, площади почечных телец и диаметре собирательных трубочек на срезах, выполненных на уровне почечной лоханки. Различия наблюдали как при сравнении мышей двух линий в нормальных условиях, так и при экспериментальном алкалозе. Кроме того, размер почек у нокаутных мышей оказался меньше, чем у мышей дикого типа. Иммуногистохимический анализ не выявил статистически значимых различий в количестве CD206 положительных (противовоспалительных) макрофагов в почках как в нормальных условиях, так и при моделировании алкалоза.

**Заключение.** Морфометрический анализ гистологических срезов выявил увеличение толщины паренхимы почек у мышей с нокаутом гена рецепторной тирозинкиназы в условиях экспериментального алкалоза по сравнению с животными дикого типа. В целом, нокаут гена рецепторной тирозинкиназы IRR не привёл к каким-либо существенным патологическим изменениям в строении почек. Таким образом, выведенная линия мышей может служить модельным объектом для физиологических и молекулярно-биологических исследований, направленных на изучение метаболического алкалоза и связанных с ним патологических процессов.

**Ключевые слова:** рецепторная тирозинкиназа IRR; алкалоз; почка; макрофаги.

**Как цитировать:**
Ганцова Е.А., Серова О.В., Деев И.Е., Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х. Морфологические особенности почек у мышей с нокаутом гена INSRR в условиях бикарбонатной нагрузки // Морфология. 2025. Т. 163, № 2. С. XX–XX. DOI: https://doi.org/10.17816/morph.636307 EDN RXWDLP

**Рукопись получена:** 21.09.2024 **Рукопись одобрена:** 21.12.2024 **Опубликована online:** 02.05.2025

ЭКО • ВЕКТОР

Статья доступна по лицензии CC BY-NC-ND 4.0 International
© Эко-Вектор, 2025

DOI: https://doi.org/10.17816/morph.636307 EDN RXWDLP

# Kidney morphology in *INSRR* gene knockout mice under bicarbonate loading conditions

Elena A. Gantsova[1,2], Oxana V. Serova[3], Ilgor E Deyev[3], Andrey V. Elchaninov[1,2,4], Timur Kh. Fatkhudinov[1,2,4]

[1]Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia;
[2]Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia;
[3]Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;
[4]Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

ABSTRACT

***BACKGROUND:*** Insulin receptor-related receptor tyrosine kinase (IRR) acts as a sensor of extracellular alkaline pH and is involved in renal bicarbonate secretion. High level of IRR expression has been found in kidney β-intercalated cells located in the distal tubules where bicarbonate secretion occurs. In order to develop a new model to study sensitivity to pH changes, a unique strain of mice with the *INSRR* gene deletion was created based on the C57BL/6 mouse strain.

***AIM:*** To identify morphological changes in kidney tissue of *INSRR* gene knockout mice compared to wild-type animals under normal conditions and in metabolic alkalosis.

***METHODS:*** The mice used in the study were the offsprings of the same generation (littermates); the genotype was confirmed by polymerase chain reaction. Two strains of mice, *INSRR* gene knockout and wild type, were used in the experiment under two conditions: normal conditions and experimental alkalosis. For morphometric analysis, we performed hematoxylin and eosin staining of kidney cryosection and immunohistochemical staining to assess the macrophages population.

***RESULTS:*** Morphometric analysis showed that *INSRR* gene knockout did not induce major pathological changes in the kidney structure. However, significant differences in parenchyma thickness, renal corpuscle area and collecting tubules diameter were found in sections taken at the level of the renal pelvis. These differences were observed both when comparing mice of the two strains under normal conditions and under experimental alkalosis. In addition, the kidneys size in knockout mice appeared to be smaller than those of the wild-type mice. Immunohistochemical analysis revealed no statistically significant changes in the number of CD206-positive (anti-inflammatory) macrophages either under normal conditions or experimental alkalosis.

***CONCLUSION:*** Morphometric analysis of histological sections revealed an increase in renal parenchyma thickness in receptor tyrosine kinase gene knockout mice under experimental alkalosis compared to wild-type animals. In general, knockout of the IRR receptor tyrosine kinase gene did not result in any significant pathological changes in renal structure. Thus, the created strain of knockout mice can be used as a model for physiological and molecular biological studies of metabolic alkalosis and related pathological processes.

**Keywords:** insulin receptor-related receptor tyrosine kinase; alkalosis; kidney; macrophages.

**To cite this article:**
Gantsova EA, Serova OV, Deev IE, Elchaninov AV, Fatkhudinov TKh. Study of the morphological structure of the kidneys of *INSRR* gene knockout mice under bicarbonate loading conditions. *Morphology*. 2025;163(2):XX–XX. DOI: https://doi.org/10.17816/morph.636307 EDN RXWDLP

**Submitted:** 21.09.2024 **Accepted:** 21.12.2024 **Published online:** 02.05.2025

ECO•VECTOR

Article can be used under the CC BY-NC-ND 4.0 International License
© Eco-Vector, 2025

# CHINA

收到: 21.09.2024 接受: 21.12.2024 发布日期: 02.05.2025

ECO•VECTOR
Article can be used under the CC BY-NC-ND 4.0 International License
© Eco-Vector, 2025

## ОБОСНОВАНИЕ

Рецептор, подобный рецептору инсулина (Insulin Receptor-Related Receptor, IRR) – рецепторная тирозинкиназа, входящая в семейство рецепторов инсулина. Характерной особенностью этих рецепторов является их димерное состояние. Связывание с лигандом вызывает конформационные изменения, приводящие к активации за счёт автофосфорилирования [1]. Обычно лигандами рецепторов этого семейства являются крупные белковые молекулы, однако лиганд для IRR до сих пор точно не установлен. В 2011 году было показано [2], что IRR выполняет функцию pH-сенсора и способен к автофосфорилированию при pH внеклеточной среды выше 7,9. Многие вопросы о функциях этой рецепторной тирозинкиназы в различных органах остаются открытыми. Известно, что другие рецепторы, входящие в семейство — рецептор инсулина IR (Insulin Receptor) и инсулиноподобный рецептор IGF-1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor) широко представлены практически во всех тканях организма, в то время как локализация IRR ограничена поджелудочной железой, почками, желудком и определёнными типами клеток в нервной системе [3]. Описан фенотип нарушения выведения бикарбоната с мочой у мышей [4], нокаутных по гену *INSRR*, кодирующему рецепторную тирозинкиназу IRR. Мыши с нокаутом гена *INSRR* могут служить моделью для исследований щелочной терапии и метаболического алкалоза. Клинические испытания с участием пациентов с хронической болезнью почек поставили вопрос о возможном терапевтическом применении бикарбоната натрия ($NaHCO_3$) для предотвращения негативных последствий ацидоза у таких пациентов. Некоторые клинические и фундаментальные научные исследования продемонстрировали, что $NaHCO_3$ замедляет снижение функциональной активности почек, оказывая тем самым благоприятное влияние на течение хронической болезни почек [5–8]. Однако физиологические механизмы, благодаря которым бикарбонатная нагрузка защищает почки, остаются неясными. Использование модельных животных позволяет проводить более целенаправленные интервенционные исследования для выявления механизмов, опосредующих защитное действие щёлочи на почки [9]. Ранее нами была охарактеризована линия мышей с нокаутом рецепторной тирозинкиназы IRR. Методом секвенирования определяли уровень экспрессии генов в почках. Сравнительный анализ обогащения набора генов в образцах мышей дикого типа и нокаутных по *INSRR* показал, что нокаут тирозинкиназы IRR изменяет экспрессию генов, связанных с метаболизмом АТФ и электрон-транспортной цепью [10].

Популяция макрофагов в почках нокаутных по гену *INSRR* животных ранее не была описана, хотя известно, что активность макрофагов, а также их про- или противовоспалительный фенотип определяются множеством факторов [11]. В настоящее время установлено, что одним из таких факторов является изменение pH [12]. В связи с этим в качестве дополнительного исследования провели гистологическую характеристику популяции макрофагов в почках.

**Цель исследования** — провести анализ морфологических изменений почек у мышей с нокаутом гена *INSRR* в сравнении с животными дикого типа в нормальных условиях и при метаболическом алкалозе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Дизайн исследования

Проведено экспериментальное проспективное сравнительное контролируемое нерандомизированное исследование с участием лабораторных животных.

### Критерии соответствия и условия проведения

Исследование проведено на самках мышей (возраст 3–4 месяца) двух генотипов: дикого типа (WT) и нокаутных по гену *INSRR* (KO) одного поколения (литтермейтсах). Линия нокаутных мышей предоставлена ГНЦ РФ ФГБНУ Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. При получении потомства первого поколения гетерозигот проводили проверку генотипа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием геномной ДНК мышей и праймеров: KO_irr1 и KO_irr2 для нокаутной аллели, mWT3 и mWT4 — для дикого типа. Продукт реакции детектировали с помощью электрофореза в агарозном геле.

Лабораторных животных содержали в виварии, со свободным доступом к воде и пище при соотношении светлого и тёмного времени суток 1:1 (12 часов).

### Продолжительность исследования

Исследование проведено в период с 2023 по 2024 год.

### Основной исход исследования

Конечными точками исследования были количественные морфометрические показатели строения почек — толщина паренхимы почек, площадь почечных телец, диаметр собирательных трубочек, а также количественная оценка популяции макрофагов в тканях почек.

### Описание вмешательства и анализ в группах

Для оценки влияния нокаута рецепторной тирозинкиназы IRR у мышей моделировали состояние метаболического алкалоза. Мышей WT и KO в течение 7 дней содержали в двух условиях: в обычных условиях — мышей поили водой, в условиях щелочной нагрузки — в питьевую воду добавляли 250 мМ бикарбоната натрия $NaHCO_3$ (pH=8,5), чтобы спровоцировать метаболический алкалоз.

Таким образом, было сформировано 4 экспериментальные группы животных: мыши дикого типа в нормальных условиях (WT_H2O) и в условиях щелочной нагрузки (WT_NaHCO3); мыши с нокаутом гена *INSRR* в нормальных

условиях (KO_H2O) и в условиях щелочной нагрузки (KO_NaHCO3). За 12 часов до эвтаназии для выравнивания метаболического уровня мышам прекращали доступ к пище, при этом питьё оставалось в свободном доступе. В эксперимент брали самок в возрасте 3–4 месяца. Для выделения органов, животных усыпляли с помощью внутримышечных инъекций смеси тилетамина, золазепама (препарат Золетил 50®; Virbac, Франция, доза 20 мг/кг) и ксилазина (доза 5 мг/кг в 0,9% растворе NaCl). Эвтаназию проводили методом цервикальной дислокации. Почки извлекали из брюшной полости, промывали в стерильном фосфатно-буферном солевом растворе и замораживали при температуре -80°C.

### Методы регистрации исходов

При нормальных условиях в качестве питья мышам давали обычную воду, а в условиях щелочной нагрузки в воду для питья добавляли бикарбонат натрия $NaHCO_3$ в концентрации 250 мМ (pH=8,5). Объёмы выпитой воды/раствора бикарбоната не учитывали.

**Генотипирование.** Для подтверждения генотипа мышей проводили ПЦР-анализ. В качестве матрицы для определения дикой и нокаутной аллели использовали геномную ДНК. Последовательности праймеров для нокаутной аллели (KO_irr1_new и KO_irr2_new) и для дикой аллели (mWT3_new и mWT4_new):

- mWT3_new 5'-GCAAGCTACACAGGCTCGAGGG-3';
- mWT4_new 5'-TGGGTTCTGATCCTCTCAAGGAG-3';
- KO_irr2_new 5'-CAAAACCAAATTAAGGGCCAGCTC-3';
- KO_irr1_new 5'-AGCCTGAAGACCCTCGTCGACT-3'.

Для каждого образца геномной ДНК проводили реакцию с каждой парой праймеров и тремя контрольными образцами — вода, известная последовательность WT и известная последовательность KO. Параметры реакции: 32 цикла амплификации; предварительная денатурация при 95°C в течение 3 мин 30 с; денатурация — 95°C 45 с; отжиг — 60°C 45 с; элонгация — 72°C 30 с; финальная достройка — 72°C 7 мин. Продукты ПЦР (приблизительно 300 пар оснований) анализировали методом электрофореза в агарозном геле, результаты детектировали на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция).

**Обзорное окрашивание гематоксилином и эозином.** Визуализацию гистологического строения почек проводили на тонких срезах толщиной 5–10 мкм. Срезы изготавливали на криотоме Leica CM-1050 (Leica Biosystems, Германия), фиксировали в 10% нейтральном буферном формалине и окрашивали 1% раствором гематоксилина (Leica Biosystems, Германия) в течение 5–10 мин, отмывали водой и окрашивали раствором эозина (Leica Biosystems, Германия) в течение 1–2 мин. Затем срезы обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (70%, 80%, 95%, 100%), просветляли в ксилоле и заключали в среду CV Mount (Leica Biosystems, Германия). Подготовленные срезы анализировали с использованием микроскопа Leica DMI8 (Leica Microsystems, Германия).

**Иммуногистохическое исследование.** Для визуализации макрофагов срезы почек инкубировали в 0,05% растворе бычьего сывороточного альбумина MACS® BSA Stock Solution (Milteniy Biotec, Германия) в течение 2 часов при 4°C, затем помещали во влажную камеру и инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами: CD86 (разведение 1:500; Abcam, Великобритания) и CD206 (разведение 1:500; Abcam, Великобритания). На следующий день срезы инкубировали со вторичными антителами (разведение 1:1000), конъюгированными с флуоресцентным красителем FITC (Fluorescein Isothiocyanate; Abcam, Великобритания); для контрастирования ядер применяли DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, разведение 1:1000; Invitrogen, США). По окончании протокола окрашивания срезы трижды промывали в фосфатно-буферном солевом растворе и заключали в среду Glycergel Mounting Medium (Dako, США).

**Морфометрия срезов почек.** На цифровых изображениях срезов почек с помощью программы Image Scope M (CMA, Россия) подсчитывали количество макрофагов, а также определяли площадь почечных телец, диаметр собирательных трубочек и толщину коркового и мозгового вещества. Количество положительно окрашенных клеток подсчитывали в 10 случайных полях зрения. Определяли долю положительно окрашенных клеток как отношение их числа к общему числу клеток в поле зрения.

### Статистический анализ

Размер выборки предварительно не рассчитывался.

Статистический анализ проводили с использованием программных пакетов Microsoft Excel (Microsoft, США), Statistica 13.5.0. (StatSoft Inc., США) и Prism 8 (GraphPad Software, США). Характер распределения значений количественных показателей оценивали по критерию Шапиро–Уилка. Для сравнения групп при нормальном распределении использовали параметрический t-критерий Стьюдента. В случаях, когда распределение отличалось от нормального, применяли непараметрические методы: U-критерий Манна–Уитни для двух независимых выборок и критерий Крускала–Уоллиса для оценки различий между несколькими независимыми группами. Статистически значимыми различия считали при уровне $p$ <0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Объекты исследования

В рамках исследования в каждую из 4 экспериментальных групп включили по 4 особи самок мышей, всего 16 животных.

### Основные результаты

Для определения влияния нокаута гена рецепторной тирозинкиназы IRR на строение почек у мышей было проведено обзорное окрашивание гематоксилином и эозином поперечных криосрезов почек на уровне почечной

лоханки. Оценивали микроскопическую структуру коркового и мозгового вещества почек, а также особенности структурных элементов нефронов.

Микроскопический анализ показал, что паренхима почек животных WT и KO как в нормальных условиях, так и при моделировании метаболического алкалоза, разделена на корковое и мозговое вещество. В корковом веществе визуализируются почечные тельца, окружённые проксимальными и дистальными извитыми канальцами. Почечные тельца структурированы, полость капсулы хорошо различима. Стенка проксимальных извитых канальцев образована однослойным кубическим эпителием с хорошо выраженной щёточной каёмкой, просвет проксимальных канальцев узкий. Стенка дистальных извитых канальцев образована однослойным кубическим эпителием, щёточная каёмка отсутствует, просвет канальцев хорошо контурирован. Мозговое вещество почек представлено в основном собирательными трубочками и тонкими канальцами. Собирательные трубочки с выраженным просветом, стенка образована высоким призматическим эпителием. Тонкие канальца имеют чёткие контуры, стенка образована плоскими эпителиоцитами.

Таким образом, на гистологических срезах почек 4 экспериментальных групп паренхима имеет типичное строение. Это позволяет сделать вывод, что нокаут гена *INSRR* не приводит к каким-либо патологическим нарушениям строения почек.

Морфометрический анализ поперечных срезов почек на уровне почечной лоханки, окрашенных гематоксилином и эозином (рис. 1), выявил различия в толщине паренхимы, площади почечных телец и диаметре собирательных трубочек между животными двух генотипов в разных условиях (рис. 2). Для оценки толщины паренхимы рассчитывали отношение измеренных значений к общему диаметру среза. В условиях нормы толщина паренхимы больше у мышей дикого типа (1436±120 мкм), чем у мышей с нокаутом гена *INSRR* (1325±67 мкм). (рис. 2, *a*). При этом в условиях алкалоза происходит увеличение толщины паренхимы как у KO мышей (1690±20 мкм), так и у животных дикого типа (1882±77 мкм). Аналогичным образом

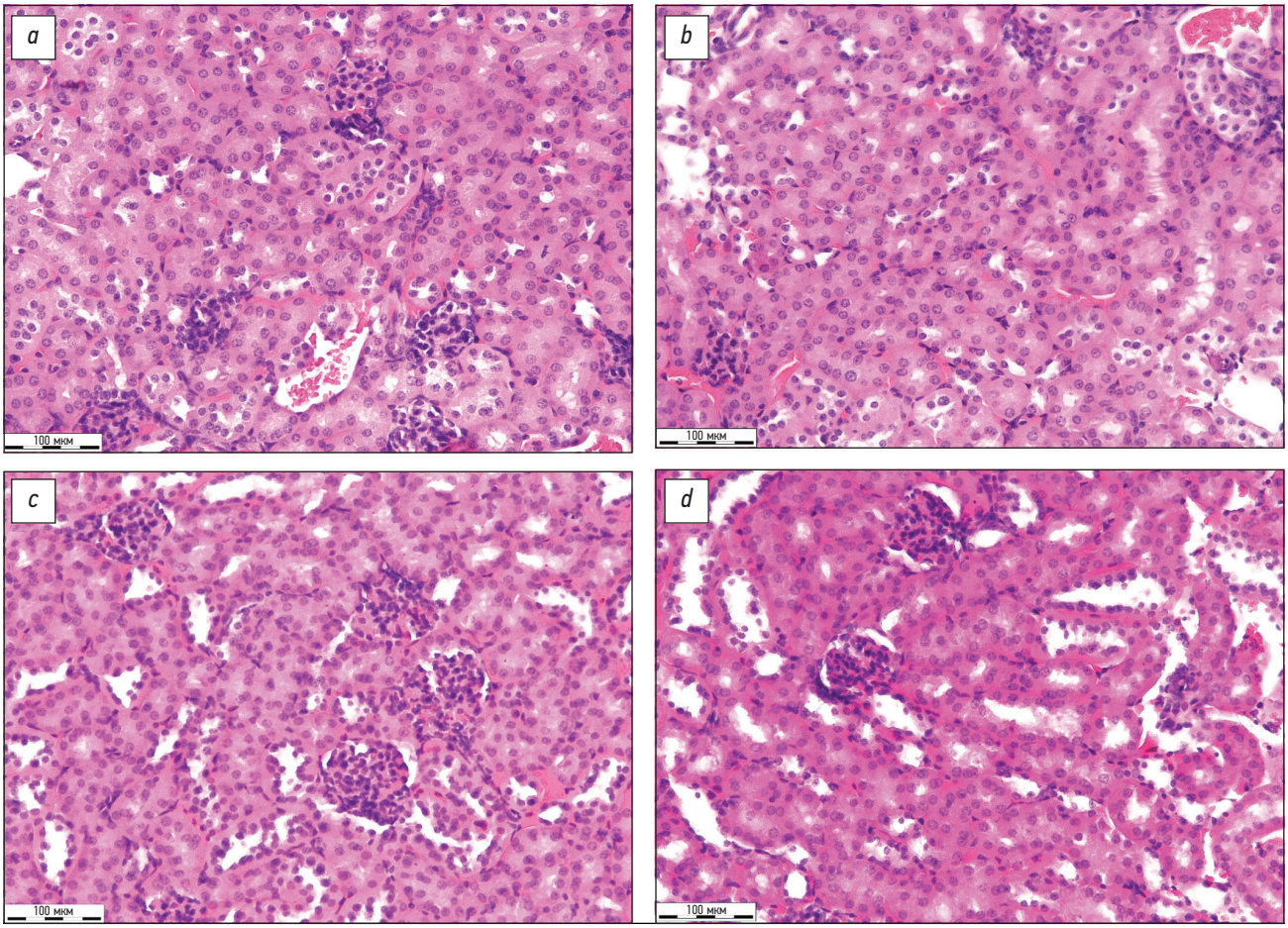


**Рис. 1.** Морфология криосрезов почек мышей: *a* — мышь дикого типа в нормальных условиях; *b* — мышь дикого типа в условиях бикарбонатной нагрузки; *c* — мышь с нокаутом гена *INSRR* в нормальных условиях; *d* — мышь с нокаутом гена *INSRR* в условиях бикарбонатной нагрузки. Окрашивание срезов гематоксилином и эозином, увеличение ×20; масштабная линейка — 100 мкм.

**Fig. 1.** Morphology of cryosections of mouse kidneys: *a* — wild-type mouse under normal conditions; *b* — wild-type mouse under bicarbonate loading; *c* — *INSRR* gene knockout mouse under normal conditions; *d* — *INSRR* gene knockout mouse under bicarbonate loading. Sections stained with hematoxylin and eosin, magnification ×20; scale bar — 100 μm.

DOI: https://doi.org/10.17816/morph.636307

! рис 2, 5 отрисовал / просьба сверить



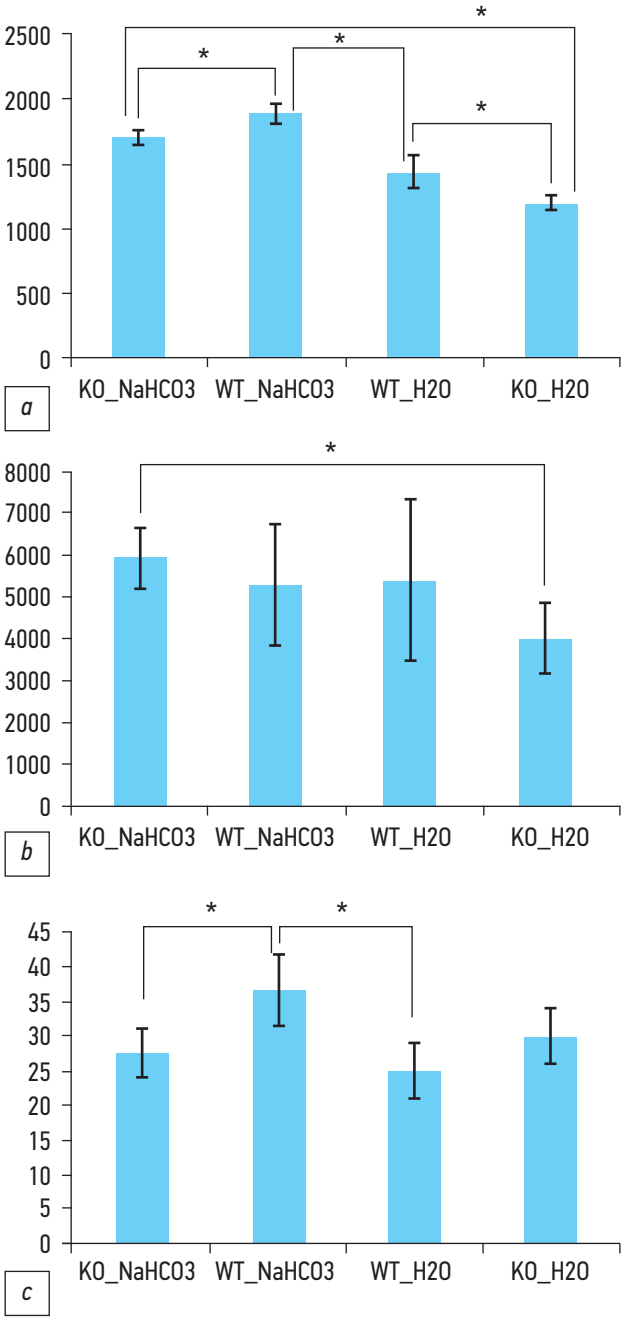


**Рис. 2.** Морфометрическая характеристика почек: *a* — относительная толщина паренхимы (в мкм); *b* — относительная площадь почечных телец (в мкм$^2$); *c* — диаметр просвета собирательных трубочек (в мкм). Обозначение групп: WT_H2O — мыши дикого типа в нормальных условиях и WT_NaHCO3 — в условиях щелочной нагрузки; KO_H2O — мыши с нокаутом гена *INSRR* в нормальных условиях и KO_NaHCO3 — в условиях щелочной нагрузки. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение; * — статистически значимые различия, $p$ <0,05.

**Fig. 2.** Morphometric characteristics of the kidneys: *a* — relative parenchyma thickness (in μm); *b* — relative area of renal corpuscles (in μm$^2$); *c* — collecting duct lumen diameter (in μm). Group designations: WT_H2O — wild-type mice under normal conditions and WT_NaHCO3 — under alkaline load; KO_H2O — *INSRR* gene knockout mice under normal conditions and KO_NaHCO3 — under alkaline load. Data are presented as mean ± standard deviation; * — statistically significant differences, $p$ <0.05.

провели измерение относительной площади почечных телец. При сравнении мышей двух генотипов не обнаружено статистически значимых различий между мышами KO и WT как в нормальных условиях, так и при алкалозе. Однако площадь почечных телец значимо выше у мышей с нокаутом гена *INSRR* в условиях экспериментального алкалоза (KO_NaHCO3) по сравнению с соответствующим контролем (KO_H2O) — 5934±753 мкм$^2$ и 3991±850 мкм$^2$ соответственно (рис. 2, *b*). Дополнительно было проведено измерение диаметра просвета собирательных трубочек у животных всех групп. Диаметр просвета собирательных трубочек у мышей дикого типа статистически значимо повышается при щелочной нагрузке (рис. 2, *c*). В случае мышей с нокаутом гена *INSRR* диаметр собирательных трубочек одинаковый в нормальных условиях и при экспериментальном алкалозе. Однако сравнение животных WT и KO в условиях бикарбонатной нагрузки показало, что у мышей дикого типа просвет собирательных трубочек статистически значимо больше, чем у нокаутных по гену *INSRR*. В целом, размер почек у нокаутных мышей меньше, чем у животных дикого типа.

Популяцию макрофагов в почках мышей характеризовали с помощью маркеров: CD86 — белок провоспалительных макрофагов, CD206 — белок противовоспалительных макрофагов. Макрофаги, экспрессирующие выбранные в исследовании белки-маркеры, распределены неравномерно между корковым и мозговым веществом. Макрофаги, положительные по CD86, преимущественно ассоциированы с почечными тельцами, внутри которых они образуют сложную сеть, затрудняющую количественную оценку (рис 3).

Макрофаги, экспрессирующие CD206, встречались как в корковом, так и в мозговом веществе. Для этой популяции макрофагов характерно расположение вблизи стенок канальцев (рис. 4). В корковом веществе CD206+ макрофаги также обнаруживались в почечных тельцах. Количественная оценка CD206+ макрофагов, ассоциированных с почечными канальцами, не выявила статистически значимых различий между животными WT и KO как в нормальных условиях, так и при моделировании алкалоза (рис. 5).

# ОБСУЖДЕНИЕ

## Резюме основного результата исследования

Морфометрическое описание предоставляет информацию о структуре и типе активности макрофагов в почечной ткани мышей, дополняя понимание роли гена *INSRR* в регуляции функций почек. Хотя анализ гистологических срезов выявил различия в строении почек у нокаутных мышей по сравнению с животными дикого типа, отсутствие патологических изменений в структуре почечной ткани позволяет лучше понять влияние нарушения экспрессии рецепторной тирозинкиназы IRR на морфологию почек.

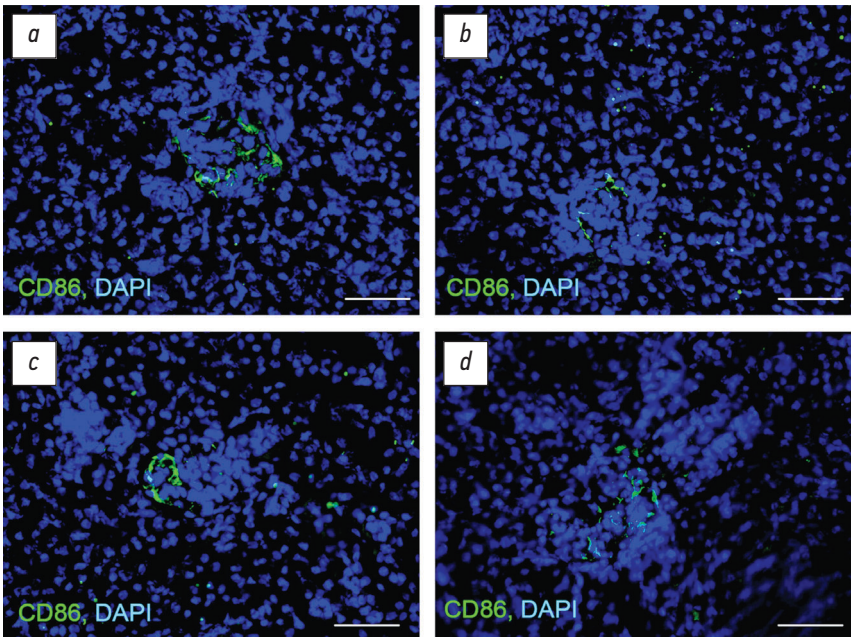


**Рис. 3.** Иммуногистохимическое исследование популяции CD86-положительных макрофагов в почках мышей: *a* — мышь дикого типа в нормальных условиях; *b* — мышь дикого типа в условиях бикарбонатной нагрузки; *c* — мышь с нокаутом гена *INSRR* в нормальных условиях; *d* — мышь с нокаутом гена *INSRR* в условиях бикарбонатной нагрузки. Зелёное свечение — CD86-положительные макрофаги (флуоресцентный краситель FITC); синее свечение — ядра клеток, окрашенные флуоресцентным красителем DAPI. Увеличение ×20; масштабная линейка — 50 мкм.

**Fig. 3.** Immunohistochemical study of the population of CD86-positive macrophages in the kidneys of mice: *a* — wild-type mouse under normal conditions; *b* — wild-type mouse under bicarbonate load; *c* — *INSRR* gene knockout mouse under normal conditions; *d* — *INSRR* gene knockout mouse under bicarbonate load. Green glow — CD86-positive macrophages (fluorescent dye FITC); blue glow — cell nuclei stained with fluorescent dye DAPI. Magnification ×20; scale bar — 50 μm.

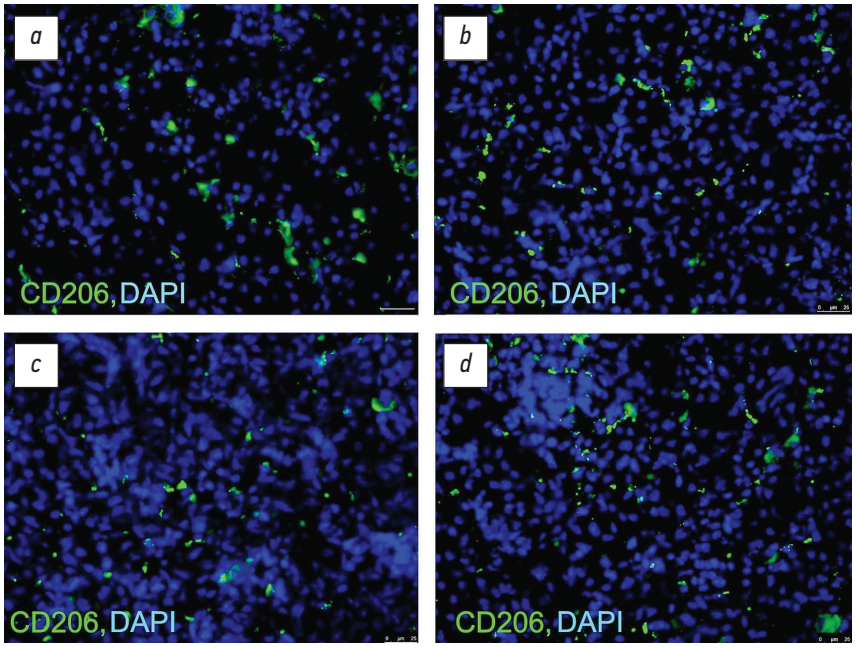


**Рис. 4.** Иммуногистохимическое исследование популяции CD206-положительных макрофагов в почках мышей: *a* — мышь дикого типа в нормальных условиях; *b* — мышь дикого типа в условиях бикарбонатной нагрузки; *c* — мышь с нокаутом гена *INSRR* в нормальных условиях; *d* — мышь с нокаутом гена *INSRR* в условиях бикарбонатной нагрузки. Зелёное свечение — CD206-положительные макрофаги (флуоресцентный краситель FITC); синее свечение — ядра клеток, окрашенные флуоресцентным красителем DAPI. Увеличение ×20; масштабная линейка — 50 мкм.

**Fig. 4.** Immunohistochemical study of the population of CD206-positive macrophages in the kidneys of mice: *a* — wild-type mouse under normal conditions; *b* — wild-type mouse under bicarbonate load; *c* — *INSRR* gene knockout mouse under normal conditions; *d* — *INSRR* gene knockout mouse under bicarbonate load. Green glow — CD206-positive macrophages (fluorescent dye FITC); blue glow — cell nuclei stained with fluorescent dye DAPI. Magnification ×20; scale bar — 50 μm.

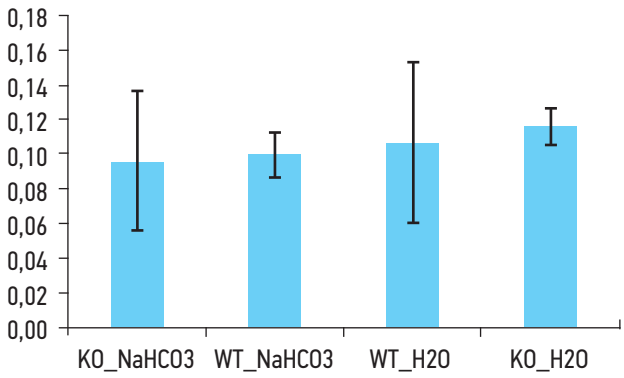


**Рис. 5.** Количество CD206-положительных макрофагов в почках мышей. Обозначение групп: WT_H2O — мыши дикого типа в нормальных условиях и WT_NaHCO3 — в условиях щелочной нагрузки; KO_H2O — мыши с нокаутом гена *INSRR* в нормальных условиях и KO_NaHCO3 — в условиях щелочной нагрузки. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

**Fig. 5.** Number of CD206-positive macrophages in mouse kidneys. Group designations: WT_H2O — wild-type mice under normal conditions and WT_NaHCO3 — under alkaline loading; KO_H2O — *INSRR* gene knockout mice under normal conditions and KO_NaHCO3 — under alkaline loading. Data are presented as mean ± standard deviation.

## Обсуждение основного результата исследования

Из проведённого микроскопического и морфометрического исследования поперечных срезов почек на уровне почечной лоханки, окрашенных гематоксилином и эозином, можно заключить, что нокаут гена рецепторной тирозинкиназы IRR не приводит к каким-либо патологическим нарушениям в строении почек. Бикарбонатная нагрузка приводила к увеличению просвета собирательных трубочек у WT-мышей (с 27,4±3,7 мкм до 36,5±5,2 мкм), но существенно не изменяла этот показатель у нокаутных животных. При этом диаметр собирательных трубочек у мышей дикого типа в условиях экспериментального алкалоза (WT_NaHCO3) статистически значимо больше, чем в группе KO_NaHCO3. Это позволяет предположить, что щелочная нагрузка изменяет клеточный профиль собирательных протоков, пролиферацию клеток в них и экспрессию рецепторов апикальной мембраны протока [13].

Нокаут гена, кодирующего рецепторную тирозинкиназу IRR, повлиял на площадь почечных телец — у KO-мышей в условиях экспериментального алкалоза (KO_NaHCO3) она значимо выше, чем у животных, которые пили воду (KO_H2O). Увеличение площади связывают с гломерулярной гипертензией и гиперфильтрацией [14]. Изменение площади почечных телец при экспериментальном алкалозе может быть связано с натрий-зависимым котранспортером глюкозы 2 (SGLT2, Sodium-Glucose Cotransporter 2), поскольку изменение экспрессии этого гена у мышей с нокаутом IRR уже описано нами ранее [10]. Участие SGLT2 в нарушении кислотно-щелочного гомеостаза в почках делает его перспективной мишенью для изучения действия различных ингибиторов [15]. Нарушение функций SGLT2 под действием ингибиторов приводит к уменьшению площади почечных клубочков мыши [16]. Установлено уменьшение толщины паренхимы у нокаутных мышей KO (IRR –/–) в условиях нормального питьевого режима. При этом в условиях моделирования алкалоза происходит увеличение толщины паренхимы как у нокаутных животных, так и у животных дикого типа. Увеличение толщины паренхимы связывают с острым повреждением почек [17], а её уменьшение — с хронической болезнью почек [18]. Обобщая полученные данные, можно предположить, что наблюдаемые изменения морфологии почек являются предвестниками начинающегося патологического процесса.

Стоит отметить, что размер почек у KO-мышей меньше, чем у WT, что возможно косвенно свидетельствует о влиянии нокаута гена *INSRR* на функционирование почек. Однако для понимания механизмов такого влияния необходимы дополнительные исследования. Тем не менее, выведенная линия мышей может служить моделью для изучения транспорта бикарбоната, а также влияния метаболического алкалоза на организм. В целом, методика нокаута широко применяется в отношении генов, отвечающих за транспорт ионов в почках, поскольку позволяет моделировать те или иные патологические состояния [19, 20]. Например, у мышей, нокаутных по натрий-протонному NHE3-транспортеру (Sodium-Hydrogen Exchanger 3), нарушен водный баланс и осмоляльность мочи [21]. Нокаут генов, кодирующих некоторые ионные каналы, такие как натрий-калий-хлорный котранспортер 2 (NKCC2, $Na^+$-$K^+$-$2Cl^-$ co-transporter 2) и калиевый канал ROMK (Renal Outer Medullary Potassium Channel), приводит к развитию почечной недостаточности и гидронефроза, несовместимых с жизнью [22, 23].

## Ограничения исследования

Исследование морфологии почек, основанное на использовании методов клонирования и генетической модификации, имеет определённые ограничения. Во-первых, необходимо учитывать, что результаты, полученные в эксперименте на животных, не всегда точно отражают реакции в организме человека на подобные молекулярные и клеточные изменения. По этой причине результаты исследований на животных не всегда могут быть прямо экстраполированы на человека без дополнительных уточнений и подтверждений. Во-вторых, необходимо учитывать, что полученные новые данные нуждаются в дополнительной валидации в других экспериментальных моделях и клинических исследованиях.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования, проведённого для оценки влияния нокаута гена *INSRR*, кодирующего рецепторную

тирозинкиназу IRR, на строение почек, показали, что корковое и мозговое вещество, а также структурные компоненты нефронов у нокаутных мышей сохраняют типичную микроскопическую структуру как в нормальных условиях, так и при моделировании алкалоза.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Вклад авторов:** Е.А. Ганцова — обзор литературы, проведение эксперимента, написание текста статьи; О.В. Серова — проведение эксперимента, редактирование текста статьи; И.Е. Деев — дизайн эксперимента, редактирование текста статьи; А.В. Ельчанинов — дизайн эксперимента, написание и редактирование текста статьи; Т.Х. Фатхудинов — курирование работы, редактирование текста статьи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

**Этическая экспертиза:** Эксперименты с участием животных проведены в соответствии с рекомендациями ARRIVE guidelines [24]. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» (протокол №8 от 29.09.2023 г.).

**Источники финансирования:** Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-45-00031 и государственного задания «Межорганные взаимодействия при регенерации печени» № 123030700110-4.

**Раскрытие интересов:** Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

## ADDITIONAL INFO

**Author contributions:** E.A. Gantsova — literature review, experimentation, drafting of the article; O.V. Serova — experimentation, editing the article; I.E. Deyev — experiment design, editing the article; A.V. Elchaninov — experiment design, writing and editing the article; T.Kh. Fatkhudinov — work supervision, editing and drafting of the article. All authors have approved the manuscript (the version to be published) and have agreed to be accountable for all aspects of the work to ensure that issues relating to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

**Ethics approval:** Animal experiments were performed in accordance with the recommendations of the ARRIVE guidelines [24]. The study protocol was approved by the local ethics committee of the Petrovsky National Research Centre of Surgery (Protocol N 8 dated 29.09.2023).

**Funding sources:** This work was supported by Russian Science Foundation (grant number 24-45-00031) and by the state assignment “Interorgan interactions during liver regeneration” N 123030700110-4.

**Disclosure of interests:** The authors have no relationships, activities or interests for the last three years related with for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

## REFERENCES

**1.** Korotkova DD, Gantsova EA, Goryashchenko AS, et al. Insulin receptor-related receptor regulates the rate of early development in *Xenopus laevis*. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16):9250. doi: 10.3390/ijms23169250

**2.** Deyev IE, Sohet F, Vassilenko KP, et al. Insulin receptor-related receptor as an extracellular alkali sensor. *Cell Metab*. 2011;13(6):679–689. doi: 10.1016/j.cmet.2011.03.022

**3.** Serova OV, Gantsova EA, Deyev IE, Petrenko AG. The value of pH sensors in maintaining homeostasis of the nervous system. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2020;46(4):369–384. (In Russ.) doi: 10.31857/S0132342320040260 EDN: PYRUCK

**4.** Petrenko AG, Zozulya SA, Deyev IE, Eladari D. Insulin receptor-related receptor as an extracellular pH sensor involved in the regulation of acid–base balance. *Biochim Biophys*. 2013;1834(10):2170–2175. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.11.011

**5.** Alva S, Divyashree M, Kamath J. et al. A study on effect of bicarbonate supplementation on the progression of chronic kidney disease. *Indian J Nephrol*. 2020;30(2):91–97. doi: 10.4103/ijn.IJN_93_19

**6.** Dubey AK, Sahoo J, Vairappan B, et al. Correction of metabolic acidosis improves muscle mass and renal function in chronic kidney disease stages 3 and 4: a randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2020;35(1):121–129. doi: 10.1093/ndt/gfy214

**7.** Di Iorio BR, Bellasi A, Raphael KL, et al. Treatment of metabolic acidosis with sodium bicarbonate delays progression of chronic kidney disease: the UBI Study. *J Nephrol*. 2019;32(6):989–1001. doi: 10.1007/s40620-019-00656-5

**8.** Goraya N, Munoz-Maldonado Y, Simoni J, Wesson DE. Fruit and vegetable treatment of chronic kidney disease-related metabolic acidosis reduces cardiovascular risk better than sodium bicarbonate. *Am J Nephrol*. 2019;49(6):438–448. doi: 10.1159/000500042

**9.** Mannon EC, O'Connor PM. Alkali supplementation as a therapeutic in chronic kidney disease: What mediates protection? *Am J Physiol Renal Physiol*. 2020;319(6):F1090–F1104. doi: 10.1152/ajprenal.00343.2020

**10.** Gantsova EA, Serova OV, Eladari D, et al. A comparative kidney transcriptome analysis of bicarbonate-loaded *insrr*-null mice. *Curr Issues Mol Biol*. 2023;45(12):9709–9722. doi: 10.3390/cimb45120606

**11.** Chen S, Saeed AFUH, Liu Q, et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):207. doi: 10.1038/s41392-023-01452-1

**12.** Wu H, Yin Y, Hu X, et al. Effects of environmental pH on macrophage polarization and osteoimmunomodulation. *ACS Biomater Sci Eng*. 2019;5(10):5548–5557. doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b01181

**13.** Genini A, Mohebbi N, Daryadel A, et al. Adaptive response of the murine collecting duct to alkali loading. *Pflugers Arch*. 2020;472(8):1079–1092. doi: 10.1007/s00424-020-02423-z

**14.** Tobar A, Ori Y, Benchetrit S, et al. Proximal tubular hypertrophy and enlarged glomerular and proximal tubular urinary space in obese subjects with proteinuria. *PLoS One*. 2013;8(9):e75547. doi: 10.1371/journal.pone.0075547

**15.** Chen H, Birnbaum Y, Ye R, et al. SGLT2 inhibition by Dapagliflozin attenuates diabetic ketoacidosis in mice with type-1 diabetes. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2022;36(6):1091–1108. doi: 10.1007/s10557-021-07243-6
**16.** Lu YP, Zhang ZY, Wu HW, et al. SGLT2 inhibitors improve kidney function and morphology by regulating renal metabolic reprogramming in mice with diabetic kidney disease. *J Transl Med*. 2022;20(1):420. doi: 10.1186/s12967-022-03629-8
**17.** Liu C, Wang X. Clinical utility of ultrasonographic evaluation in acute kidney injury. *Transl Androl Urol*. 2020;9(3):1345–1355. doi: 10.21037/tau-20-831
**18.** Gupta P, Chatterjee S, Debnath J, et al. Ultrasonographic predictors in chronic kidney disease: A hospital based case control study. *J Clin Ultrasound*. 2021;49(7):715–719. doi: 10.1002/jcu.23026
**19.** Fenton RA, Knepper MA. Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. *Physiol Rev*. 2007;87(4):1083–1112. doi: 10.1152/physrev.00053.2006
**20.** Gantsova E, Serova O, Vishnyakova P, et al. Mechanisms and physiological relevance of acid-base exchange in functional units of the kidney. *PeerJ*. 2024;12:e17316. doi: 10.7717/peerj.17316
**21.** Amlal H, Ledoussal C, Sheriff S, et al. Downregulation of renal AQP2 water channel and NKCC2 in mice lacking the apical Na+-H+ exchanger NHE3. *J Physiol*. 2003;553(Pt 2):511–522. doi: 10.1113/jphysiol.2003.053363
**22.** Takahashi N, Chernavvsky DR, Gomez RA, et al. Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(10):5434–5439. doi: 10.1073/pnas.090091297
**23.** Lorenz JN, Baird NR, Judd LM, et al. Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a model for type II Bartter's syndrome. *J Biol Chem*. 2002;277(40):37871–37880. doi: 10.1074/jbc.M205627200
**24.** Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *BMC Vet Res*. 2020;16(1):242. doi: 10.1186/s12917-020-02451-y

## ОБ АВТОРАХ

***Ганцова Елена Александровна;**
адрес: Россия, 1117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3;
ORCID: 0000-0003-4925-8005;
eLibrary SPIN: 6486-5795;
e-mail: gantsova@mail.ru

**Серова Оксана Викторовна,** канд. хим. наук;
ORCID: 0000-0002-4941-8913;
eLibrary SPIN: 8459-4496;
e-mail: oxana.serova@gmail.com

**Деев Игорь Евгеньевич,** д-р биол. наук;
ORCID: 0000-0002-2041-808X;
eLibrary SPIN: 4570-9775;
e-mail: deyevie@gmail.com

**Ельчанинов Андрей Владимирович,** д-р мед. наук, доцент;
ORCID: 0000-0002-2392-4439;
eLibrary SPIN: 5160-9029;
e-mail: elchandrey@yandex.ru

**Фатхудинов Тимур Хайсамудинович,** д-р мед. наук, профессор;
ORCID: 0000-0002-6498-5764;
eLibrary SPIN: 7919-8430;
e-mail: fatkhudinov_tkh@pfur.ru

## AUTHORS INFO

***Elena A. Gantsova;**
address: 3 Tsyurupy st, 117418, Moscow, Russia;
ORCID: 0000-0003-4925-8005;
eLibrary SPIN: 6486-5795;
e-mail: gantsova@mail.ru

**Oxana V. Serova,** Cand. Sci. (Chemistry);
ORCID: 0000-0002-4941-8913;
eLibrary SPIN: 8459-4496;
e-mail: oxana.serova@gmail.com

**Deyev Igor Evgenievich,** Dr. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0002-2041-808X;
eLibrary SPIN: 4570-9775;
e-mail: deyevie@gmail.com

**Andrew V. Elchaninov,** Dr. Sci. (Medicine), Assistant Professor;
ORCID: 0000-0002-2392-4439;
eLibrary SPIN: 5160-9029;
e-mail: elchandrey@yandex.ru

**Timur Kh. Fatkhudinov,** Dr. Sci. (Medicine), Professor;
ORCID: 0000-0002-6498-5764;
eLibrary SPIN: 7919-8430;
e-mail: fatkhudinov_tkh@pfur.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author