

УДК 577.112:577.215

Декомпенсированный метаболический алкалоз у мышей с нокаутом гена *insrr*

И. Е. Деев¹, Д. И. Ржевский², А. А. Берчатова², О. В. Серова¹, Н. В. Попова¹,
А. Н. Мурашев², А. Г. Петренко^{1*}

¹Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

²Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Пущино Московской обл., ул. Институтская, 6

*E-mail: petrenkoag@gmail.com

Поступила в редакцию 12.05.2011 г.

РЕФЕРАТ Молекулярные механизмы, обеспечивающие поддержание кислотно-щелочного равновесия в организме, до сих пор остаются малоизученными. Развитие алкалоза представляет непосредственную угрозу для жизни человека. Понимание физиологических механизмов компенсации алкалоза будет способствовать появлению новых терапевтических подходов и новых лекарственных средств, эффективных при подобных нарушениях метаболизма. Ранее мы обнаружили, что в слабощелочной среде активируется «сиротский» рецептор, подобный рецептору инсулина (insulin receptor-related receptor, IRR). В представленной работе проведен анализ линии мышей с направленной инактивацией гена *insrr*, кодирующего рецептор IRR, и выявлены их фенотипические отличия, обусловленные нарушением регуляции кислотно-щелочного равновесия. При индукции экспериментального алкалоза в крови мышей с нокаутом рецептора IRR наблюдалось повышение содержания бикарбоната и CO₂.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА алкалоз, IRR.

ВВЕДЕНИЕ

IRR – это рецепторная тирозинкиназа, принадлежащая к мини-семейству инсулинового рецептора, в которое входят рецепторы инсулина и инсулиноподобного фактора роста [1]. кДНК рецептора IRR была клонирована в 1989 году [2], однако до настоящего времени не обнаружено природных агонистов IRR пептидной или белковой природы [3].

В отличие от своих близких гомологов, которые присутствуют в широком спектре тканей и клеток, IRR синтезируется только в определенных тканях и в небольших популяциях клеток. Наибольшее количество IRR выявлено в почках, где он находится лишь в β-вставочных клетках, субпопуляции эпителиальных клеток, выстилающих дистальные каналцы [4]. Эти клетки контактируют с почечным фильтратом, рН которого, в отличие от крови, может существенно изменяться, в том числе и в щелочную сторону. IRR синтезируется также в энтерохромаффиноподобных клетках желудка [5], которые секретируют гистамин, стимулирующий секрецию кислоты, что сопряжено с оттоком щелочи от стенки желудка в кровь. Значительное количество IRR обнаружено в β- и α-клетках островков Лангерганса, которые могут контактировать со щелочным панкреатическим соком [6]. Нами обнаружено, что IRR, в отличие от его

гомологов, способен активироваться при рН > 8.0 [7, 8] и, предположительно, является клеточным сенсором слабощелочной внеклеточной среды. Подобная функция IRR хорошо согласуется с его распределением в тканях и клетках.

С целью выявления функциональных особенностей IRR мы провели фенотипический анализ мышей с нокаутом гена *insrr*, кодирующего этот рецептор. Оказалось, что у таких мышей нарушен компенсаторный ответ на экспериментально индуцированный алкалоз.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Антитела и Вестерн-блот-анализ

Получали антитела кролика против слитого с глутатион-S-трансферазой (GST) фрагмента 539–686 IRR мыши [8]. Антитела очищали на BrCN-сефарозе с пришитым белком, содержащим фрагмент 539–686 IRR мыши и шесть остатков гистидина. Белки подвергали электрофоретическому разделению в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS), а затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану. С целью уменьшения неспецифической сорбции мембрану инкубировали в буфере milk/TBS-T (5% обезжирен-

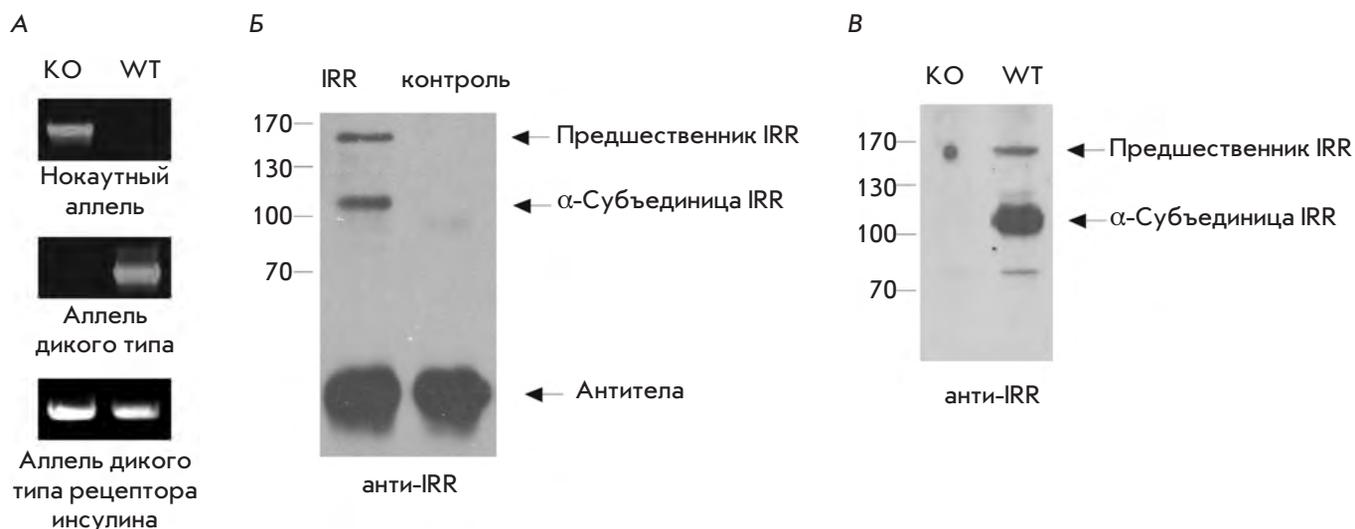


Рис. 1. Анализ инактивации гена *insrr* у мышей. **А** – ПЦР на геномной ДНК мышей дикого типа и с нокаутом гена *insrr* с использованием праймеров к дикому аллелю IRR, IR и инактивированному аллелю IRR. **Б** – Вестерн-блоттинг с использованием антител против участка в эктодомене IRR. На дорожки нанесены белки, осажденные из лизатов клеток HEK293, трансфицированных вектором, обеспечивающим экспрессию рецептора IRR, и нетрансфицированных клеток (контроль), антителами против эпитопа HA. **В** – Вестерн-блоттинг с использованием антител против участка в эктодомене IRR на WGA-элюатах (*wheat germ agglutinin*, агглютинин зародышей пшеницы) из мембран почки мышей дикого типа и с нокаутом гена *insrr*. На каждую дорожку нанесено по 10 мкг белка элюатов.

ного молока, 20 мМ Трис-НСl, рН 7.6, 140 мМ NaCl, 0.1% Твин-20) в течение ночи при 4°C. Для детекции белков мембрану инкубировали с первичными антителами (1 : 5000 по объему) в течение 60 мин при комнатной температуре, промывали ТБС-Т и инкубировали с вторичными антителами к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (1 : 10000 по объему) в течение 1 ч. Связавшиеся антитела выявляли с использованием системы хемилюминесценции SuperSignal West Pico [9].

Эксперименты с животными

Мыши с нокаутом IRR получены оплодотворением *in vitro* замороженной спермой мышей с нокаутом всех генов семейства рецептора инсулина, т.е. с тройным нокаутом [10]. Опыты проводили на половозрелых бодрствующих самцах мышей с направленной инактивацией только гена *insrr*. Генотипирование проводили согласно [10]. Контролем служили мыши линии C57BL6. Животных содержали в Питомнике лабораторных животных ФИБХ (г. Пущино) в стандартных условиях (температура 21 ± 2°C, влажность 30–70%, цикл освещения – 12/12 ч), корм и воду мыши получали *ad libitum*.

Опыты проводили на бодрствующих животных. Мышам в хвостовую вену вводили 1.3% раствор NaHCO₃ (200 мкл/10 г веса тела) в течение 5 с. Об-

разцы крови анализировали за 30 мин до введения NaHCO₃ (точка 0) и через 5 и 15 мин после инъекции. Кровь собирали через ретроорбитальный синус пластиковыми капиллярами (Lithim-Heparin, 50 ед./мл) и анализировали на газоанализаторе электролитов крови (Bloodgas analyzer Rapidpoint 405, «Siemens»). Все манипуляции выполняли в соответствии с протоколом, утвержденным институтской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения гомозиготной линии мышей с нокаутом IRR мы скрестили животных с нокаутом гена *insrr*, а также генов рецепторов инсулина и инсулиноподобного фактора роста (тройной гетерозиготный нокаут [10]) с мышами дикого типа той же линии (C57BL6). Присутствие аллелей с нокаутом гена *insrr* и отсутствие аллелей с нокаутом генов рецепторов инсулина и инсулиноподобного фактора роста проверяли с помощью ПЦР на геномной ДНК мышей (*рис. 1А*).

Синтез белка IRR у мышей с нокаутом гена *insrr* мы анализировали с помощью полученных нами антител, которые специфично распознают участок в эктодомене рецептора IRR (*рис. 1Б*). Окрашивание этими антителами вестерн-блотов частично очищенных

Параметры крови мышей дикого (WT) типа и с нокаутом гена *insrr* (КО)

Электролиты крови	Мыши WT		Мыши КО	
	Среднее значение	Погрешность	Среднее значение	Погрешность
pH	7.21	0.03	7.29	0.02
PCO ₂ , мм рт.ст.	50	1.5	49	1.5
PO ₂ , мм рт.ст.	41	0.8	42	0.8
BE, ммоль/л	-8.4	1.8	-4.2	1.2
TCO ₂ , ммоль/л	21.4	1.6	24.4	1.0
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	19.9	1.6	22.9	1.0
Na, ммоль/л	148	0.9	148	0.8
K, ммоль/л	6.2	0.1	6.3	0.2
Ca, ммоль/л	1.25	0.0	1.24	0.0
tHb, г/л	16.8	0.3	18.0	0.4
Hct, %	50	1.0	54	1.1

Примечание. В каждой группе было по восемь мышей. Указаны: pH крови, PCO₂ – содержание углекислого газа, PO₂ – содержание кислорода, BE – отклонение концентрации буферных оснований от нормального уровня, TCO₂ – общее содержание углекислого газа, HCO₃⁻ – содержание бикарбоната, Na – содержание натрия, K – содержание калия, Ca – содержание кальция, tHb – содержание гемоглобина, Hct – гематокритное число.

экстрактов мембран почек нормальных мышей и мышей с нокаутом гена *insrr* доказало, что у полученных нами мышей отсутствует белок IRR (*рис. 1B*).

Первичный анализ, выполненный в обычных условиях, не выявил существенных отличий мышей с нокаутом гена *insrr* от нормальных мышей той же линии [11], поэтому мы провели две серии опытов на мышах дикого типа и на мышах с инактивированным геном *insrr* – в нормальных условиях и при индуцированном алкалозе.

В первой серии опытов мы определили 11 параметров крови у находившихся в обычных условиях мышей из обеих групп (по восемь животных в группе). Оказалось, что у мышей с нокаутом гена *insrr* содержание бикарбоната в крови (22.9 ± 1.0 против 19.9 ± 1.6 , $p < 0.05$), а также pH (7.29 ± 0.02 против 7.21 ± 0.03 , $p < 0.05$) и гематокрит (54 ± 1.1 против 50 ± 1.0 , $p < 0.05$) были выше, чем у животных дикого типа. Остальные параметры крови практически не отличались (*таблица*).

Во второй серии опытов отобрали две группы животных – 10 мышей дикого типа или 12 особей нокаутного типа. Метаболический алкалоз индуцировали внутривенным введением 1.3% раствора NaHCO₃ (200 мкл/10 г веса мыши). Параметры крови определяли в начале опыта, через 5 и 15 мин после щелочной нагрузки. Через 5 мин после инъекции щелочного раствора динамика изменения концентрации бикарбоната и pH крови у мышей с нокаутом IRR была такой же, как и у мышей дикого типа, т.е. наблюдалось повышение pH (от 7.24 ± 0.03 до 7.34 ± 0.02 , $p < 0.05$ у мышей дикого

типа и от 7.33 ± 0.01 до 7.36 ± 0.02 , $p < 0.2$ при нокауте IRR), а также содержание бикарбоната (от 19.25 ± 0.98 до 23.47 ± 1.06 , $p < 0.05$ у мышей дикого типа и от 23.64 ± 0.63 до 26.43 ± 0.53 , $p < 0.05$ при нокауте) (*рис. 2A,B*). У мышей обеих групп через 15 мин после индукции алкалоза pH крови стал несколько ниже, чем через 5 мин (7.33 ± 0.03 у мышей дикого типа и 7.35 ± 0.02 при нокауте). Однако у мышей с нокаутом IRR через 15 мин отмечено существенное повышение содержания бикарбоната и концентрации CO₂ в крови по сравнению с мышами дикого типа (*рис. 2B,B*). Таким образом, животные дикого типа и с нокаутом гена *insrr* по-разному реагировали на острый экспериментальный алкалоз, вызванный введением бикарбоната в кровь.

ВЫВОДЫ

Ранее мы показали, что IRR является сенсором внеклеточной щелочной среды, а его отсутствие в организме приводит к нарушению компенсации метаболического алкалоза, вызванного многодневным кормлением животных щелочной пищей. Этот эффект имел в своей основе нарушение секреции бикарбоната почками у мышей с нокаутом IRR [8]. Результаты изучения компенсации индуцированного алкалоза в острых (5–15 мин) условиях подтверждают нашу гипотезу о компенсаторной роли IRR в секреции бикарбоната. Мы можем заключить, что IRR-зависимая компенсация алкалоза происходит достаточно быстро. Интересно, что у мышей с нокаутом IRR также наблюдается компенсация алкалоза, судя по снижению pH крови, однако это про-

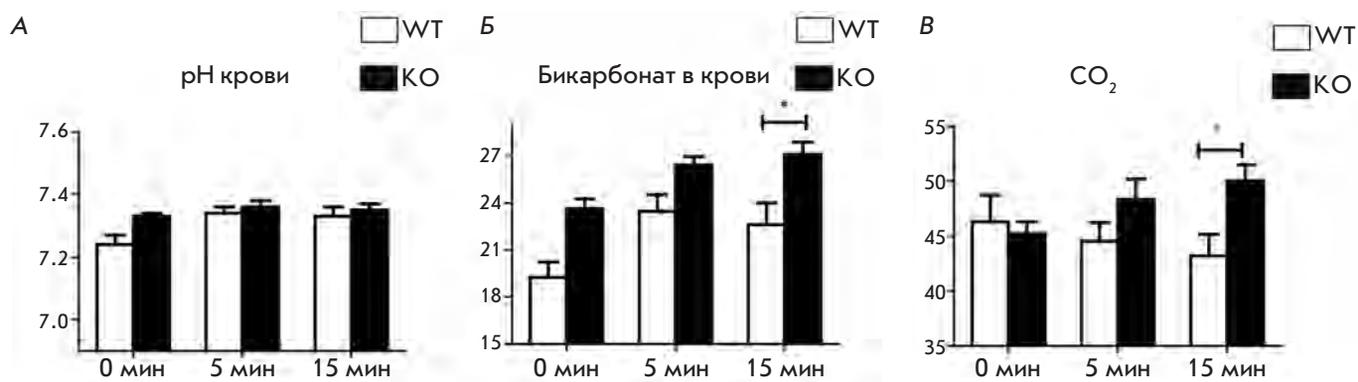


Рис. 2. Параметры крови мышей дикого типа (WT) и с нокаутом гена *insrr* (KO) до и после инъекции бикарбоната. А – pH крови. Б – Концентрация бикарбоната (ммоль/л). В – Содержание CO₂ в крови (мм рт.ст.). **p* < 0.05 по критерию Стьюдента.

исходит не вследствие секреции избыточного бикарбоната, а в результате повышения концентрации CO₂ в крови, что, по-видимому, вызвано замедлением дыхания или ускорением метаболизма. Таким образом, мы можем заключить, что IRR является существенной частью одного из физиологических механизмов регуляции кислотно-щелочного равновесия, а линия мышей с нокаутом IRR может найти применение в качестве животной модели патологического развития метаболического алкалоза. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 06-04-49706а, 09-04-01644-а, 10-04-01794-а и 09-04-12201-офи_м), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marino-Buslje C., Martin-Martinez M., Mizuguchi K., Siddle K., Blundell T.L. // *Biochem. Soc. Trans.* 1999. V. 27. P. 715–726.
2. Shier P., Watt V.M. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 14605–14608.
3. Dissen G.A., Garcia-Rudaz C., Tapia V., Parada L.F., Hsu S.Y., Ojeda S.R. // *Endocrinology.* 2005. V. 147. № 1. P. 155–165.
4. Bates C.M., Merenmies J.M., Kelly-Spratt K.S., Parada L.F. // *Kidney Int.* 1997. V. 52. P. 674–681.
5. Tsujimoto K., Tsuji N., Ozaki K., Ohta M., Itoh N. // *Endocrinology.* 1995. V. 136. P. 558–561.
6. Hirayama I., Tamemoto H., Yokota H., Kubo S.K., Wang J., Kuwano H., Nagamachi Y., Takeuchi T., Izumi T. // *Diabetes.* 1999. V. 48. P. 1237–1244.
7. Deev I.E., Vasilenko K.P., Kurmangaliev E., Serova O.V., Popova N.V., Galagan Y.S., Burova E.B., Zozulya S.A., Nikol'skii N.N., Petrenko A.G. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2006. V. 408. P. 184–187.
8. Deyev I.E., Sohet F., Vassilenko K.P., Serova O.V., Popova N.V., Zozulya S.A., Burova E.B., Houillier P., Rzhnevsky D.I., Berchatova A.A., et al. // *Cell Metab.* 2011. V. 13. P. 679–689.
9. Deyev I.E., Petrenko A.G. // *Biochimie.* 2010. V. 92. P. 418–422.
10. Nef S., Verma-Kurvari S., Merenmies J., Vassalli J.D., Efstratiadis A., Accili D., Parada L.F. // *Nature.* 2003. V. 426. P. 291–295.
11. Kitamura T., Kido Y., Nef S., Merenmies J., Parada L.F., Accili D. // *Mol. Cell Biol.* 2001. V. 21. P. 5624–5630.