

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ГЛОМЕРУЛЯРНОГО ФИЛЬТРА ПОЗВОНОЧНЫХ: РОЛЬ ЗАРЯДА ДЛЯ ФИЛЬТРАЦИИ БЕЛКОВ

© 2023 г. Е. В. Балботкина¹, А. В. Кутина^{1,*}

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

*e-mail: kutina_anna@mail.ru

Поступила в редакцию 09.10.2023 г.

После доработки 23.10.2023 г.

Принята к публикации 23.10.2023 г.

Почечный клубочек — уникальная структура, отличающая нефроны позвоночных от нефридиев беспозвоночных животных, обеспечивающая непосредственную связь кровеносной и выделительной систем и наиболее эффективный контроль состава внутренней среды за счет значительной интенсификации фильтрации. Рассмотрены современные представления о структуре гломерулярного фильтра у представителей всех основных групп позвоночных животных (круглоротые, рыбы, амфибии, рептилии и птицы, млекопитающие). Сделан акцент на роли заряда структур гломерулярного клубочка для его селективных свойств, описаны подходы к изучению вклада анионных компонентов клубочка в предотвращение потери белков плазмы крови. Рассмотрены представленные в литературе основные модели работы гломерулярного фильтра. Продемонстрировано, что отрицательный заряд является отличительной чертой гломерулярного фильтра у всех позвоночных. Показано, что многократный рост скорости клубочковой фильтрации (от низших позвоночных к птицам и млекопитающим) сопровождался рядом структурных изменений, обеспечивающих прохождение значительного объема воды и растворенных низкомолекулярных веществ через гломерулярный фильтр: увеличение числа и упорядоченности фенестр в эндотелии гломерулярных капилляров, утончение гломерулярной базальной мембраны и полное исключение из нее клеточных элементов. Данные проведенного сравнительно-физиологического анализа гломерулярного барьера у разных групп позвоночных в наибольшей степени свидетельствуют о справедливости электрокинетической модели работы фильтра, так как именно она объясняет важность эволюционно консервативной структуры подоцитов и роль совокупности фиксированных отрицательных зарядов в стенке гломерулярного фильтра для предотвращения потери макромолекул (прежде всего белков) из крови при различной интенсивности ультрафильтрации.

Ключевые слова: гломерулярный фильтр, заряд, гломерулярная базальная мембрана, подоцит, гликозаминогликан, гликокаликс, позвоночные

DOI: 10.31857/S0044452923060025, EDN: GXCYJ

ВВЕДЕНИЕ

Почечный клубочек — уникальная структура, отличающая нефроны позвоночных от нефридиев беспозвоночных животных, включая бесчерепных [1]. Именно клубочек, осуществляющий непосредственную связь кровеносной и выделительной систем, обеспечивает наиболее эффективный контроль состава внутренней среды за счет значительной интенсификации фильтрации [2]. В ряду позвоночных от круглоротых до птиц и млекопитающих прослеживается отчетливая тенденция к росту скорости гломерулярной фильтрации. Скорость клубочковой фильтрации возрастает с 0.5–1.2 мл/ч/100 г веса у круглоротых и рыб до 42–50 мл/ч/100 г веса у млекопитающих и 16–30 мл/ч/100 г веса у птиц [3, 4]. Несмотря на такое существенное повышение скорости, качество ультрафильтрации не снижается: гломерулярный фильтр млекопитающих эф-

фективно задерживает большинство макромолекулярных соединений, препятствуя их попаданию в мочу. Прошло уже несколько десятков лет с первых описаний ультраструктурной организации стенки клубочковых капилляров с помощью электронной микроскопии, но общепринятой теории о механизмах, посредством которых клубочковый фильтр ограничивает трансмуральный переход большинства белков плазмы, нет [5]. Многочисленные исследования показали, что возможность прохождения макромолекул из крови в пространство капсулы Боумена зависит от их размера, конфигурации и электрического заряда. В последние годы ставится под сомнение важность заряда структур гломерулярного фильтра в ограничении фильтрации белков, и, в частности, альбумина [6].

В настоящем обзоре собраны данные о строении и функциональных свойствах фильтрационного барье-

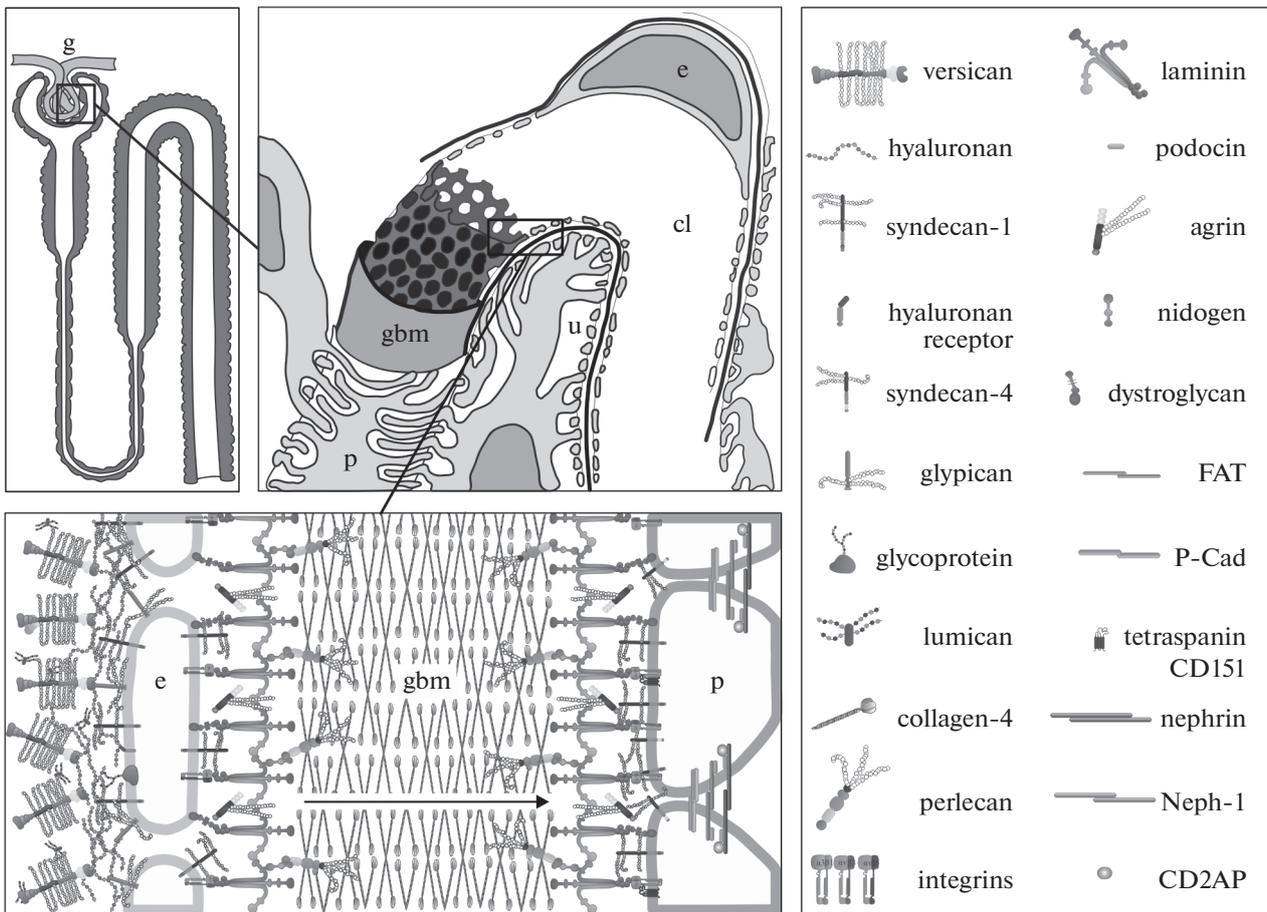


Рис. 1. Схема строения нефрона, стенки гломерулярного капилляра и клубочкового фильтра на клеточном и молекулярном уровне. cl – просвет капилляра, e – эндотелий, g – почечный клубочек, gbm – ГБМ, p – подоцит, u – мочевое пространство. Стрелка – направление, в котором происходит ультрафильтрация.

ра у разных групп позвоночных, рассмотрены основные гипотезы о механизмах ультрафильтрации в клубочке. Проанализированы экспериментальные работы последних лет, посвященные изучению заряд-селективных свойств клубочкового фильтра. Поиск оригинальных экспериментальных статей осуществлялся по базе PubMed (временной интервал 2000–2023 гг.) по ключевым словам: glomerular, filter or barrier, charge.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРУКТУРЕ ГЛОМЕРУЛЯРНОГО ФИЛЬТРА ПОЗВОНОЧНЫХ

Гломерулы являются одной из основных частей нефрона позвоночных, исключение представляют лишь некоторые морские костистые рыбы, имеющие агломерулярные нефроны [2]. У миксин около 60 гломерул, открывающихся короткими шеечными отделами в один из двух архинефрических протоков [7]. У миног несколько клубочков объединяются вместе в гломус с общим мочевым пространством, из которого начинаются каналцы нефронов [8]. У всех

остальных позвоночных каждый нефрон имеет собственный капиллярный клубочек. Количество нефронов и соответственно клубочков в почках различных позвоночных варьирует от 2 в пронефрозе рыб, до миллиона в каждой почке (метанефрозе) у млекопитающих. Интересно, что возрастание интенсивности функционирования клубочка не сопровождается радикальными перестройками его микроанатомии. Структура фильтрационного барьера от круглоротых до млекопитающих чрезвычайно консервативна и образована одними и теми же элементами (рис. 1): фенестрированный эндотелий, гломерулярная базальная мембрана (ГБМ) и подоциты [9].

ЭНДОТЕЛИЙ ГЛОМЕРУЛЯРНЫХ КАПИЛЛЯРОВ

Почечные клубочки у позвоночных варьируют по размеру, а также по числу и диаметру капилляров, входящих в их состав [8, 10]. Для круглоротых и хрящевых рыб характерны очень крупные капиллярные клубочки, у представителей остальных

классов позвоночных они существенно мельче. Диаметр микрососудов (в том числе клубочковых капилляров) у млекопитающих меньше, чем у большинства позвоночных, что связывают с различиями в размерах эритроцитов [11].

Первая часть клубочкового фильтра представлена гломерулярным эндотелием, особенностью которого является наличие в нем сквозных отверстий — фенестр. У представителей разных классов позвоночных численность и ширина фенестр в эндотелии варьируют. У круглоротых и хрящевых рыб фенестры в эндотелии встречаются редко [8, 12], у остальных групп фенестры встречаются регулярно и составляют существенную часть от площади капилляров. Предполагается, что при росте скорости клубочковой фильтрации фенестры необходимы для обеспечения беспрепятственного потока значительных объемов воды и растворенных веществ. У млекопитающих до 30% поверхности гломерулярных капилляров занято фенестрами [13, 14].

По данным просвечивающей электронной микроскопии наблюдаются некоторые межвидовые различия в диаметре фенестр: 100–300 нм у *Rana catesbeiana*, *Geotrypetes seraphini*, *Necturus maculosus* [15–17], 60–120 нм у *Xenopus laevis* [18], 50–200 нм у головастика *Bufo viridis* [19], 80–185 нм у черепахи *Pelodiscus sinensis* [20], 30–150 нм у крысы, 40–100 нм у утконоса [21], 60–80 нм у человека [22]. По данным сканирующей электронной микроскопии размер фенестр у млекопитающих (*Rattus norvegicus*, *Oryctolagus cuniculus*), рептилий (*Iguana iguana*), амфибий (*Rana catesbeiana*) и костистых рыб (*Cyprinus carpio*) составляет около 80 нм [23]. Изначально первому компоненту клубочкового барьера не придавалась большого значения в ограничении прохождения альбумина и других белков плазмы крови, так как диаметр фенестр в эндотелии намного превышает размер белков, которые в норме задерживаются почечным фильтром (орозомукоид — 2.9 нм, альбумин — 3.6 нм, трансферрин — 4.3 нм, IgG — 5.5 нм, α₂-макроглобулин — 9.0 нм, фибриноген 10.8 нм) [5, 14]. Использование методов визуализации гликокаликса с введением различных красителей или маркерных молекул показало, что нативный гликокаликс эндотелия гломерулярных капилляров и адсорбированные на нем компоненты формируют слой толщиной 200–400 нм и практически полностью перекрывают фенестры и ограничивают свободную фильтрацию макромолекул [14, 24–26].

Гликокаликс эндотелиальных клеток состоит из закрепленных на мембране протеогликанов и сиалопротеинов, которые в сочетании с секретиремыми протеогликанами и гиалуроновой кислотой образуют организованный, чрезвычайно гидратированный гель. В гликокаликсе в области фенестр выше соотношение гепарансульфата и гиалуроновой кислоты к сиалопротеинам, чем в участках

между фенестрами. Молекулы гликокаликса эндотелиальных клеток проникают в субэндотелиальную ГБМ, а также в эндотелиальный поверхностный слой со стороны просвета капилляров [22].

Протеогликаны состоят из сердцевинного белка и набора ковалентно связанных с ним боковых цепей гликозаминогликанов (ГАГ) (обычно не менее 60% молекулярной массы). В дополнение к ГАГ цепям протеогликаны также могут быть модифицированы разветвленными боковыми цепями олигосахаридов, некоторые из которых оканчиваются сиаловой кислотой. ГАГ представляют собой длинные неразветвленные полимеры из повторяющихся дисахаридных звеньев. Некоторые ГАГ сильно сульфатированы, вследствие чего имеют выраженный отрицательный заряд (гепарансульфат, хондроитинсульфат). Из ГАГ наиболее распространенными в гликокаликсе эндотелия являются гепарансульфат и несulfатированный ГАГ гиалуронан. Методом стохастической оптической реконструктивной микроскопии показано, что пучки гепарансульфата отходят вертикально от эндотелиальных клеток и переплетаются с горизонтально расположенными длинными нитями гиалуронана, образуя организованную решетчатую сеть на поверхности клеток [27].

У позвоночных гиалуроновая кислота синтезируется вне комплекса Гольджи гиалуронан-синтазами, кодируемыми тремя различными генами (*has1–3*), а разрушается гиалуронидазами 1 и 2 и Сем1 и 2 (гиалуронидазы, индуцирующие миграцию клеток). Полимеры гиалуроновой кислоты имеют размер от 1000 до 10000 кДа и связывают по 15 молекул воды на каждый дисахарид. На люминальной поверхности эндотелиальных клеток гиалуроновая кислота связывается с другими компонентами гликокаликса и поверхностного слоя эндотелия, в том числе с секреторными протеогликанами [14, 24, 27].

Гепарансульфат и другие сульфатированные ГАГ (хондроитинсульфат, дерматансульфат, кератансульфат) собираются на сердцевинных белках различных протеогликанов в комплексе Гольджи специфическими глюкуронилтрансферазами и затем подвергаются специфическим модификациям (деацетилирование, сульфатирование, эполимеризация). Некоторые протеогликаны являются интегральными трансмембранными белками (синдеканы), некоторые ковалентно связаны с внешним слоем плазматической мембраны с помощью гликозилфосфатидилинозитол-якоря (глипиканы), а другие секретируются (перлекан, версикан, люмикан) [14].

Синдеканы 1–4 представляют собой повсеместно распространенные протеогликаны трансмембранного типа, однократно пронизывающие мембрану. Молекулярный вес их сердцевинных белков составляет 20–45 кДа. Внеклеточные домены синде-

кана 1 и 3 содержат гепарансульфат и хондроитинсульфат, в то время как синдеканы 2 и 4 включают только гепарансульфат. Показано, что синдеканы 1 и 4 преимущественно экспрессируются в подоцитах, а синдекан 3 — в гломерулярных эндотелиальных клетках [28]. Глипиканы (1–6) представляют собой протеоглики, состоящие из белков массой 60–70 кДа и боковых цепей гепарансульфата. С-концы глипиканов прикреплены к плазматической мембране через гликозилфосфатидилинозитол-якоря. В эндотелиальных клетках преобладает глипикан-1 [14].

Версикан — основной секреторный хондроитинсульфат-содержащий протеогликан эндотелия. Его сердцевинный белок с молекулярным весом около 400 кД имеет четыре сплайс-варианта с разным числом участков связывания с хондроитинсульфатом. Он взаимодействует с клетками через интегриновые и неинтегриновые рецепторы. Показана его выработка гломерулярным эндотелием [29] и подоцитами [28]. Перлекан — очень крупный протеогликан, состоящий из белка с молекулярной массой 470 кДа и трех цепей ГАГ (по 40 кДа), прикрепленных к N-концу. С-конец перлекана взаимодействует с трансмембранными интегринными. Перлекан, продуцируемый эндотелиальными клетками, в качестве ГАГ содержит гепарансульфат и секретируется в субэндотелиальный матрикс и в люминальный поверхностный слой эндотелиальных клеток [30]. Декорин, бигликан и люмикан — секреторные протеоглики с небольшим сердцевинным белком (40 кДа) с умеренным количеством цепей ГАГ (кератансульфат, хондроитинсульфат, дерматансульфат), в субэндотелиальном матриксе взаимодействуют с коллагеном [14].

Сиаломуцины (подокаликсин, эндогликан, эндомуцин) — интегральные гликопротеины плазматической мембраны, каждый из которых имеет один трансмембранный домен, большой внеклеточный “муциновый” домен и цитоплазматический домен, который взаимодействует с белками цитоскелета. “Муциновый” домен богат сериновыми, треониновыми и пролиновыми остатками, к которым прикрепляются гликаны с концевыми сиаловыми кислотами, несущими отрицательный заряд [14].

ГЛОМЕРУЛЯРНАЯ БАЗАЛЬНАЯ МЕМБРАНА (ГБМ)

Вторая часть клубочкового фильтрационного барьера представлена ГБМ. Эта структура оказалась наиболее вариабельной у разных групп позвоночных. Прослеживается общая тенденция к уменьшению толщины ГБМ от низших к высшим позвоночным (рис. 2) (круглоротые > хрящевые рыбы > амфибии > млекопитающие). Но и в пределах одной группы позвоночных могут быть существенные различия строения гломерулярного фильтра в зависимости от скорости клубочковой

фильтрации и адаптации работы почек к разным средам обитания (пресная или морская вода, пересыхающие водоемы, пустыни). Наибольшая вариабельность строения почек и ГБМ, в частности, характерна для костистых рыб и рептилий [10]. Для животных с более низкой скоростью клубочковой фильтрации характерна более толстая ГБМ, чем у представителей с высокой скоростью фильтрации [31]. Показано, что у мигрирующих рыб при смене среды обитания происходит динамическая перестройка ГБМ [32–34].

Классически в ГБМ выделяют три слоя: субэндотелиальный менее плотный слой (*lamina rara interna*), центральный электронноплотный слой (*lamina densa*) и субэпителиальный менее плотный слой (*lamina rara externa*). ГБМ представлена межклеточным матриксом и волокнами, которые вырабатываются эндотелием гломерул и подоцитами. У птиц и млекопитающих ГБМ практически не содержит клеточных элементов [35, 36]. Специализированная соединительная ткань в клубочке (мезангий) располагается ближе к основанию капилляров у млекопитающих или единым скоплением в центре клубочка у птиц [8, 11, 37]. У большинства рептилий и низших позвоночных мезангий распространяется в ГБМ, за счет этого происходит расширение субэндотелиального слоя. У круглоротых [12], хрящевых [38] и часто у костистых рыб [39, 40] мезангиальные клетки и их отростки окружают гломерулярные капилляры по всему периметру. Мезангиальный матрикс состоит из рыхло расположенных коллагеновых фибрилл и различных тонких фибрилл. У круглоротых (миксины) и хрящевых рыб (акулы, скаты) непосредственно под эндотелием выявляется его собственная прерывистая базальная мембрана [8, 36, 38], чего нет у костистых и двоякодышащих рыб [33, 39, 40]. У амфибий число клеточных элементов в перикапиллярном пространстве варьирует. У *Rana catesbeiana* описывают значительное число мезангиальных клеток вокруг капилляров [15], но у большинства изученных видов (*Xenopus laevis*, *Rana temporaria*, *Geotrypetes seraphini*, *Necturus maculosus*) в субэндотелиальный слой ГБМ заходят только отростки мезангиальных клеток [8, 16, 17, 41]. Плотность упаковки фибрилл (тонкие 3–8 нм в диаметре, более толстые 13–14 нм в диаметре, поперечно-исчерченные коллагеновые фибриллы 55–80 нм в диаметре) разная от участка к участку, а некоторые области субэндотелиального пространства вообще лишены волокон. У рептилий субэндотелиальное пространство в основном бесклеточное (*Iguana iguana*, *Thamnophis sirtalis*, *Pelodiscus sinensis*), у некоторых видов содержит отростки мезангиальных клеток (*Podarcis taurica*) [20, 23].

У миноги *Lampetra fluviatilis* общая толщина базальной мембраны гломуса составляет около 900 нм (*lamina rara externa* и центральный плотный слой по 50 нм, субэндотелиальный слой толщиной

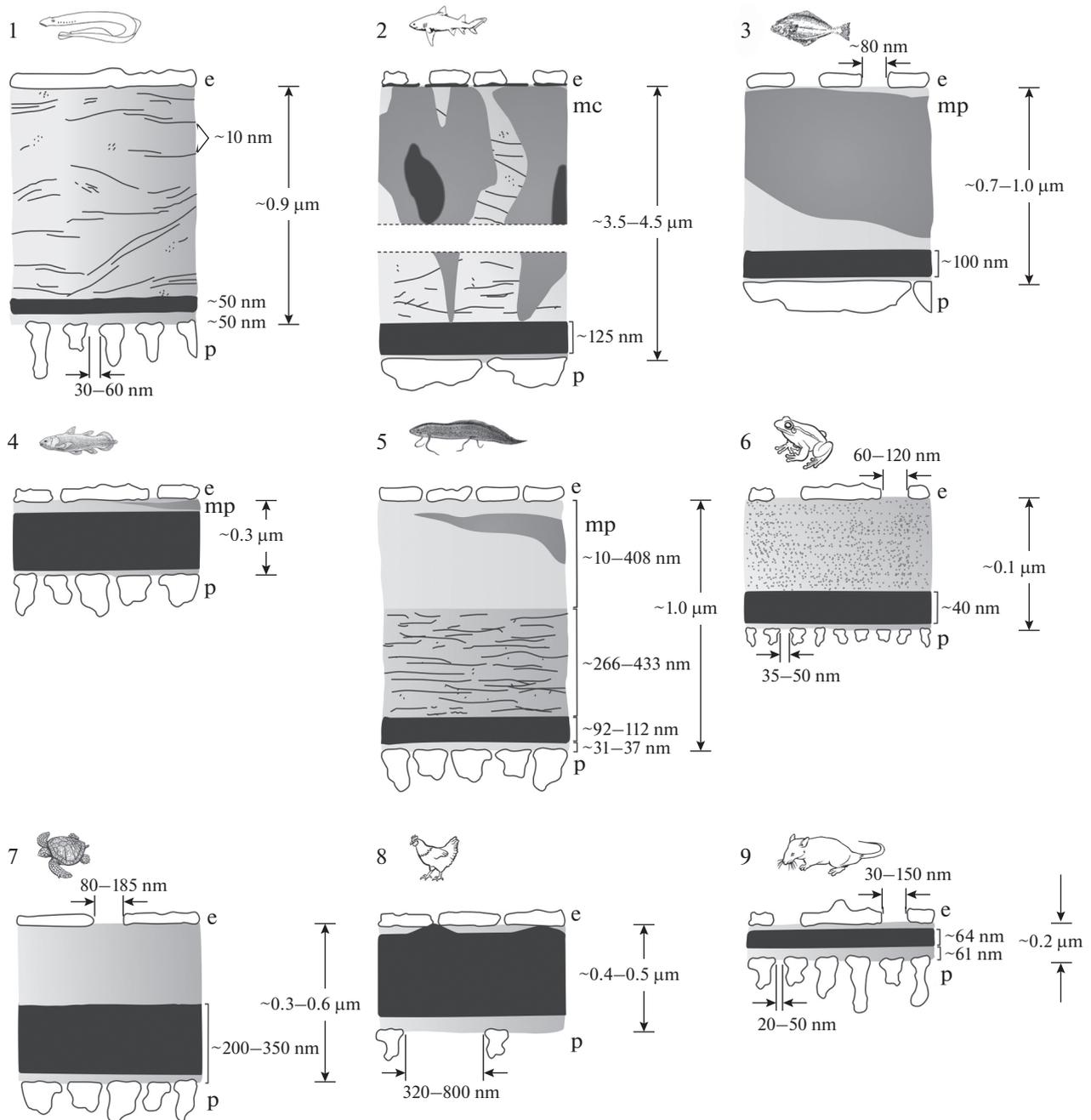


Рис 2. Схематичное изображение структуры ГБМ у представителей разных групп позвоночных. 1 – *Lampetra fluviatilis*, 2 – *Squalus acanthias*, 3 – *Parophrys vetulus*, 4 – *Latimeria chalumnae*, 5 – *Protopterus dolloi*, 6 – *Rana temporaria*, 7 – *Pelodiscus sinensis*, 8 – *Gallus gallus*, 9 – *Rattus norvegicus*, e – эндотелий, mc – мезангиальная клетка, mp – отросток мезангиальной клетки, p – подоцит.

800 нм, имеющий фибриллярное строение) [8]. У морских костистых рыб (*Trachurus mediterraneus*, *Chelon auratus*, *Diplodus annularis*, *Spicara flexuosa*, *Gobius niger*, *Mullus barbatus ponticus*, *Scorpaena porcus*, *Parophrys vetulus*) толщина ГБМ варьирует в диапазоне 660–1000 нм [33, 39, 42]. У латимерии *Latimeria chalumnae* и у многих пресноводных костистых рыб умеренная толщина ГБМ (около

300 нм), что, по-видимому, способствует образованию большого количества клубочкового фильтрата [31, 43]. У двоякодышащей рыбы *Protopterus dolloi* ГБМ очень толстая – до 1000 нм (*lamina rara externa* 31–37 нм, *lamina densa* 92–112 нм, остальное – субэндотелиальный слой) [40]. У амфибий ГБМ чаще средняя по толщине, но может быть значительной (субэндотелиальный слой 100–1000 нм, плотный

центральный слой 30–400 нм) [8, 15, 17, 41]. У рептилий выраженность перикапиллярного мезангия имеет большую видовую вариабельность, а толщина ГБМ составляет от 800 до 1600 нм у чешуйчатых [20, 23], 300–600 нм у черепахи [20, 23]. У птиц общая толщина ГБМ 350–500 нм [37], у млекопитающих – 110–400 нм [21, 44], например у крысы в среднем составляет 156 нм (центральный слой 64 нм, субэндотелиальный – 31 нм, субэпителиальный – 61 нм) [36].

ГБМ с ее плотной волокнистой сетью, вероятно, обеспечивает большую часть клубочкового гидравлического сопротивления, будучи при этом хорошо проницаемой для воды и низкомолекулярных растворенных веществ. Химический состав и организация ГБМ наиболее полно изучены у млекопитающих [45]. Работы, выполненные на представителях других классов позвоночных, указывают на принципиальное сходство структуры ГБМ позвоночных. Основу ГБМ составляют коллагеновые волокна (IV тип) и ламинин (800-кДа гетеротримерный белок из α , β и γ -гликопротеиновых цепей) [46]. Также в ГБМ располагаются многочисленные протеогликаны, основные из которых коллаген VIII, агрин, перлекан, версикан и синдеканы. Часть из них являются компонентами гликокаликса мембран ножек подоцитов и эндотелиальных клеток гломерулярных капилляров. Визуализация ГБМ у млекопитающих [47] со сверхвысоким разрешением (STORM-микроскопия) выявила высокоупорядоченную структуру с двумя различными сетями из ламинина и двумя отдельными сетями из коллагена IV, которые организованы независимо подоцитами и эндотелиальными клетками. Сети ламинина и коллагена IV не взаимодействуют друг с другом непосредственно, существует множество молекул-мостиков (например, нидогены [45]), которые их стабилизируют, предположительно образуя плотную, гелеобразную субстанцию, препятствующую прохождению макромолекул. Основная часть коллагена IV, формирующая центральную часть в ГБМ, секретируется подоцитами и представлена коллагеновыми $\alpha 3(\alpha 4)\alpha 5(IV)$ протомерами [48, 49]. Отдельный более тонкий слой коллагеновых волокон в ГБМ, расположенный ближе к эндотелию (примерно на глубине 60 нм), формируется за счет секреции эндотелиоцитами коллагеновых протомеров $\alpha 1(\alpha 2)(IV)$ [47]. Ламинин и агрин образуют два слоя внутри ГБМ, в каждом слое оба белка ориентированы своими С-концевыми доменами ближе к клеточным мембранам, а N-концевыми доменами обращены к внутренней части ГБМ. Эти данные подтверждаются и биохимическими исследованиями, показавшими, что С-концевые домены ламинина и агрина взаимодействуют с клеточными рецепторами (интегрины, дистрогликаны) [47].

Заряд ГБМ обеспечивается сульфатированными ГАГ (главным образом, гепарансульфат) протеогликанов, гиалуроновой кислотой и в меньшей степени карбоксильными и сиалильными группами гликопротеинов. Анионные участки обнаруживаются вдоль обеих *laminae rarae*, но наиболее заметны субэпителиально [50].

ПОДОЦИТЫ

Подоциты представляют из себя наиболее константную часть гломерулярного барьера у позвоночных. Сравнительно недавнее исследование подоцитов всех классов позвоночных животных с использованием методов сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии выявило принципиальное сходство подоцитов всех изученных видов [51]. Подоциты синтезируют компоненты ГБМ, участвуют в регуляции проницаемости гломерулярного фильтра, а также поддерживают форму капилляров, препятствуя их расширению под действием гидравлического давления. Это высокоспециализированные клетки сложной формы, которые имеют тело, обращенное в сторону мочевого пространства, основные отростки (первичные и вторичные), располагающиеся в плоскости параллельной базальной мембране и оплетающие гломерулярные капилляры со всех сторон, и тончайшие выросты длиной 1–1.5 мкм – ножки [51] (рис. 1, 3). Представления о строении подоцитов сравнительно недавно были дополнены данными, полученными методом сканирующей электронной микроскопии серийных срезов с 3D-реконструкцией (Serial block-face scanning electron microscopy) [52]. Обычно у подоцита 4–6 первичных отростков, которые могут давать вторичные отростки (угол ветвления меняется в пределах 30–150°) [51]. От нижней поверхности тела подоцита и от всех основных отростков вниз образуются гребневидные выступы, от которых начинаются ножки [52]. Ножки подоцитов и основания гребневидных выступов контактируют с ГБМ. Таким образом, тела подоцитов и их основные отростки всегда отделены от поверхности капилляров, они приподняты над ГБМ за счет гребневидных выступов [52]. Это довольно необычно для эпителиальных клеток, и позволяет предположить, что такая особенность важна для функционирования гломерулярного фильтра. Ножки соседних подоцитов переплетаются и между ними формируются тонкие щели, перекрытые специализированными межклеточными контактами – щелевыми диафрагмами (видоизмененный плотный межклеточный контакт). Щелевые диафрагмы всегда формируются между ножками разных подоцитов, т.е. не наблюдается взаимодействия ножек соседних отростков одного подоцита [53] (рис. 3). Для поддержания сложной формы подоцита критически важен цитоскелет. В основе первичных и вторичных отростков лежат микро-

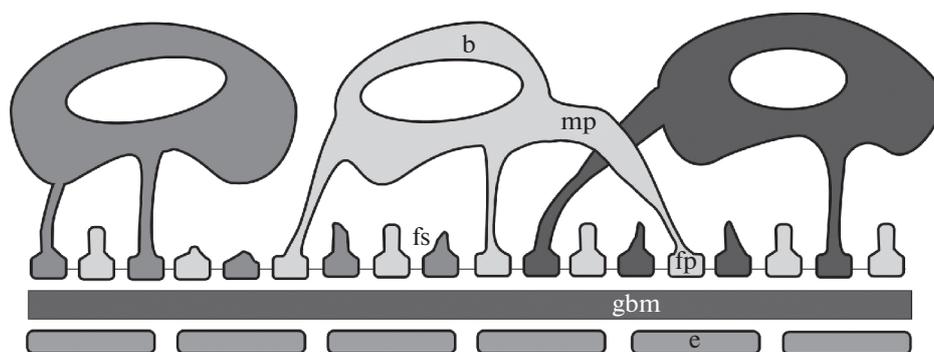


Рис. 3. Схематичное изображение трех соседних подоцитов. b – тело подоцита, e – эндотелий, gbm – ГБМ, fp – ножки подоцита, fs – фильтрационные щели, mp – основной отросток подоцита.

трубочки, а в ножках подоцитов ключевым компонентом является актин [54]. Кортикальная активная сеть под плазматической мембраной ножек подоцитов в отдельных точках связывается со специализированными белками щелевой диафрагмы (особенно нефрином, подоцином и Neph1) [55].

Мембрана ножек подоцитов покрыта достаточно выраженным слоем гликокаликса, который включает мембранные протеогликаны, содержащие сульфатированные ГАГ и сиалированные гликоконъюгаты и несущие выраженный отрицательный заряд. Основным сиалопротеином на подоцитах является сильно гликозилированный белок подокаликсин. Внеклеточный домен подокаликсина имеет сложную разветвленную структуру и несет отрицательный заряд, а внутриклеточный связан с цитоскелетом. Подоциты также продуцируют мембранные протеогликаны (глипикан 1, синдеканы 1 и 4, декорин, бигликан) и секреторные протеогликаны, входящие в состав ГБМ (агрин, перлекан, версикан) [56]. Считается, что гликокаликс подоцитов выполняет две основные функции: участвует в заряд-селективной фильтрации, т.е. не пропускает в мочевое пространство отрицательно заряженные молекулы белков и поддерживает фильтрационные щели в открытом состоянии, обеспечивая функционирование щелевых диафрагм [57].

Ширина фильтрационных щелей составляет порядка 40 нм, этот показатель практически одинаков у представителей разных групп позвоночных (у амфибий 35–50 нм, у млекопитающих – 25–60 нм) [5]. Исключения составляют птицы, у которых ширина фильтрационных щелей примерно на 40–80% больше, чем у млекопитающих, а полианионный заряд меньше. Вероятно, по этой причине мочеточниковая моча птиц обычно содержит примерно в 100 раз больше белка (5 мг/мл), чем мочеточниковая моча млекопитающих [58]. На настоящий момент белки, образующие щелевые диафрагмы, идентифицированы и наиболее подробно изучены у млекопитающих, а также выявлены их гомологи у представителей других классов позвоночных [18, 59]. Основными бел-

ками, формирующими соединение соседних ножек подоцитов, являются нефрин и подоцин, которые экспрессируются исключительно в щелевой диафрагме. Нефрин и подоцин оказались крайне консервативными, и их гомологи обнаруживаются не только у позвоночных, но и у беспозвоночных животных. Некоторое время считалось, что единственной группой позвоночных, лишенных нефрина, являются птицы, так как в их геноме не обнаруживали генов соответствующих белков [60, 61]. Однако недавние работы с использованием метода ПЦР единичных клеток позволили обнаружить ряд генов (и среди них *nphp1*), которые не выявлялись при полногеномном секвенировании ДНК из-за большого количества ГЦ-повторов в некоторых участках хромосом у птиц [62]. Таким образом, нефрин и подоцин представляют собой белки, критически важные для формирования межклеточных контактов между ножками подоцитов. Белки образуют гибкие пружиноподобные мостики, которые препятствуют прохождению макромолекул, а также прикрепляют цитоскелет к плазматической мембране. Генетические дефекты этих белков вызывают врожденный нефритический синдром финского типа (нефрин) и стероид-резистентный нефритический синдром (подоцин) [63].

Нефрин – трансмембранный белок, содержащий примерно 1200 аминокислотных остатков, кодируемый геном *nphp1*. В почке только подоциты экспрессируют нефрин. Нефрин имеет короткий внутриклеточный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен с восемью IgG-подобными фрагментами и одним фибронектин-III-подобным. Длина внеклеточного домена нефрина составляет около 35 нм [64]. Молекулы нефрина из соседних ножек подоцитов гомофильно взаимодействуют друг с другом в середине фильтрационной щели и формируют каркас щелевой диафрагмы [9]. В комплексе с нефрином находятся также белки Neph1, Neph2, ZO-1, FAT1, FAT2, P-cadherin и другие. Внутриклеточный домен нефрина через бел-

ки подоцин и CD2-ассоциированный белками связан с актиновым цитоскелетом клетки и принимает участие в передаче внутриклеточных сигналов.

Подоцин – шпилькообразный интегральный мембранный белок массой 42 кДа, кодируемый геном *nphs2*, способствующий структурной организации щелевой диафрагмы. В отличие от нефрина и Neph1, его N- и C-концы располагаются внутриклеточно [65]. Подоцин взаимодействует с внутриклеточными доменами нефрина и Neph1, а также с CD2-ассоциированным белком. У мышей с нокаутом гена подоцина развивается тяжелая протеинурия, и они умирают в течение нескольких дней после рождения [65].

ВЗАИМОСВЯЗЬ АНИОННОГО ЗАРЯДА И ПРОНИЦАЕМОСТИ СТРУКТУР ГЛОМЕРУЛЯРНОГО ФИЛЬТРА

Как было показано в предыдущих разделах обзора, все элементы клубочкового фильтрационного барьера почек позвоночных содержат значительное количество анионных полимеров. Под избирательностью к заряду частиц понимают свойство клубочкового фильтра затруднять прохождение отрицательно заряженных макромолекул по сравнению с нейтральными или положительно заряженными. Представления базировались на наблюдениях, что у крыс альбумин имеет более низкий коэффициент фильтрации по сравнению с фикоаллом и декстранами эквивалентного размера (3.6 нм). Также показано, что через клубочковый фильтр проходит 11% нейтрального декстрана, 42% декстрана в катионной форме, в то время как отрицательно заряженные молекулы декстран-сульфата практически не фильтруются; аналогичные данные были показаны для пероксидазы хрена и миоглобина с различным зарядом [6]. Суммарный отрицательный заряд гломерулярного фильтра у млекопитающих оценивается в 50 мэкв/л [66].

Анионные сайты в различных структурах гломерулярного фильтра у всех групп позвоночных были продемонстрированы с использованием различных красителей (альциановый синий, рутениевый красный, сафранин O) и катионных тестовых молекул (ферритин, пероксидаза, катионный коллоид какодилата железа, полиэтиленимин). Исследования проницаемости клубочков почек миксины (*Paramyxine atami Dean*), и двух видов миног *Entosphenus japonicus* и *Petromyzon marinus* продемонстрировали, что гломерулярный фильтр круглоротых по числу и распределению анионных сайтов сравним с таковым в клубочке млекопитающих [67–69]. Отрицательно заряженные структуры выявлялись на поверхностях эндотелиальных клеток, а также в толстой фиброзной пластинке *rara interna* ГБМ клубочков и на поверхности подоцитов и их ножек. Как для миноги, так и для миксины было показано, что нативный анионный ферритин при

инъекции в дорсальную часть аорты лишь в минимальной степени проникал через стенку капилляра, тогда как катионизированные молекулы ферритина быстро проникали в ГБМ через fenestры в эндотелии капилляров и впоследствии выводились в мочевые пространства через промежутки между ножками подоцитов [67, 68]. В исследовании на почках камбалы (*Pseudopleuronectes americanus*) было показано, что структуры гломерулярного фильтра имеют отрицательный заряд; катионизированный ферритин связывался с внутренней пластинкой ГБМ с регулярными интервалами в 60 нм. Продемонстрирована значимость анионного гломерулярного барьера для снижения почечного клиренса анионных пептидов-антифризов (3–8 кДа, pI менее 5), имеющихся в крови камбалы в зимний период [39]. Данные о распределении анионных сайтов также были получены на рыбке *Danio rerio* с использованием полиэтиленимина [70]. На 15 видах рептилий из различных сред обитания было показано, что ГБМ, в отличие от других эпителиальных базальных мембран, содержит кислые мукополисахариды (сиалированные гликопротеиды) [71]. В почках представителей всех семи классов позвоночных животных с использованием красителей анионные сайты были выявлены в гликокаликсе эндотелиальных и эпителиальных (подоциты) клеток, в *lamina rara interna* и *lamina rara externa* ГБМ, на поверхности коллагеновых волокон и микрофибрилл в мезангии [36].

За десятилетия изучения свойств гломерулярного фильтра и механизмов ультрафильтрации были использованы разнообразные экспериментальные подходы для оценки роли заряда фильтра в целом, а также его отдельных элементов для предотвращения потери белка. В целом их можно разделить на подходы, которые были направлены на не селективное снижение плотности анионных сайтов во всех структурах почечного фильтра, и те, в которых анализировался вклад конкретных протеогликанов.

Первая категория более многочисленна. Показано, что гиперэкспрессия гепараназы (единственный эндогенный фермент, расщепляющий гепарансульфат) [72], вымывание нековалентно связанных с эндотелием клубочковых капилляров анионных молекул [73], введение антител к гепарансульфату протеогликанов [74] приводили к развитию альбуминурии. Напротив, у трансгенных мышей с сахарным диабетом, у которых отсутствует гепараназы, альбуминурия не развивается. Более того, альбуминурия уменьшалась за счет ингибирования гепараназы у мышей дикого типа при диабете [75]. На рыбках *Danio rerio* показана значимость сульфатирования гепарансульфата для сохранения целостности и барьерных свойств гломерулярного фильтра, продемонстрировано развитие протеинурии у рыбок, нокаутных по генам *sulf1*, *sulf2a* и *sulf2b*, кодирующим 6-O-эндосульфатазы [76]. В другой работе, напротив, показано, что глобаль-

ный дефицит гепарансульфата, вызванный нокаутом гена *ext2* (кодирует фермент полимеризации ГАГ), существенно не влияет на проницаемость клубочкового фильтра для декстрана массой 70 кДа, несмотря на снижение плотности анионных сайтов в структурах фильтра [70]. Это может указывать на роль остаточных анионных компонентов (например, коллаген 4 типа с отрицательно заряженными остатками сиаловых кислот) для обеспечения зарядовой селективности гломерулярного фильтра [70].

При ферментативном удалении отрицательно заряженных остатков сиаловых кислот из гликозилированных белков (главным образом из гликокаликса) с помощью нейроминидазы наблюдалось повышение проницаемости эндотелия для альбумина *ex vivo* [77]. У мышей с индуцибельной делецией гена галатозилтрансферазы, фермента необходимого для сиалирования всех сиаломуцинов, наблюдаются уменьшение количества анионных сайтов в гломерулярном фильтрационном барьере и выраженная альбуминурия [78]. Делеция у мышей гена другого фермента сиалирования (трансферазы цитидинмонофосфат-сиаловой кислоты) вызывает у животных массивную протеинурию и раннюю перинатальную смертность [79].

При инфузии гиалуронидазы наблюдали уменьшение высоты гликокаликса эндотелиальных клеток в гломерулярных капиллярах и увеличение экскреции альбумина [25]. У пациентов с сахарным диабетом обнаружено, что более высокие уровни циркулирующей гиалуроновой кислоты и гиалуронидазы ассоциированы с развитием микроальбуминурии, а нарушение эндотелиального гликокаликса связано со значительным снижением содержания гиалуроновой кислоты в эндотелии клубочков [80].

Нейтрализация анионных участков в почечном фильтре (преимущественно в ГБМ) с помощью поликатионов (протамина сульфат, гексадиметрин, поли-L-лизин) приводит к повышению проницаемости для анионных макромолекул, в том числе и для альбумина [81]. В наших работах был выявлен сходный эффект при введении крысам производных нитроаргина [82, 83]. Работы, проведенные на изолированных ГБМ [84], в отличие от работ *in vivo*, не продемонстрировали селективность ГБМ в отношении заряда фильтрующихся молекул и поставили под сомнение важность нативного анионного заряда фильтра для ограничения прохождения белков плазмы.

Исследование животных (крысы Munich Wistar Fromter, крысы Zucker с ожирением), у которых с возрастом спонтанно развивается альбуминурия, продемонстрировало значимость гликокаликса и эндотелиального поверхностного слоя. С помощью многофотонной микроскопии *in vivo* была выявлена потеря эндотелиального гликокаликса в гломерулярных и мезентериальных микрососудах у

старых крыс Munich Wistar Fromter [85]. У крыс Zucker развитие альбуминурии с возрастом сопровождается потерей эндотелиального поверхностного слоя в сосудах клубочков, гиперфильтрацией макромолекул и потерей экспрессии синдекана 1 в клубочках [86]. Показано снижение экспрессии гломерулярного версикана у мышей с сахарным диабетом [87].

Среди работ с избирательным подходом хотелось бы упомянуть следующие результаты. На рыбе *Danio rerio* изучен синтез мембранных протеогликанов гликокаликса эндотелия и подоцитов (версикан, синдеканы). Показано, что нокаут гена версикана (но не синдеканов 3 и 4) снижает барьерные свойства стенки гломерулярных капилляров, приводит к сглаживанию ножек подоцитов, повреждению эндотелия, потере белков плазмы, развитию отеков [28]. Адриамицин снижает экспрессию гломерулярного версикана, *in vivo* это приводит к уменьшению толщины клубочкового гликокаликса и поверхностного слоя эндотелия и увеличению коэффициента фильтрации альбумина [88]. Эндотелий-специфичная делеция *has2* у взрослых мышей вызывала снижение гиалуроновой кислоты в клубочковых капиллярах и уменьшение мечения катионным ферритином, сопровождавшееся прогрессирующей протеинурией, изменениями ультраструктуры гломерулярных эндотелиальных клеток и инволюцией капилляров [89]. Показано, что мыши с подоцит-специфичным нокаутом генов *agr1* и *perlecan*, а также гена *ext3*, кодирующего фермент гликозилирования [90], имели существенные отличия (примерно на 50%) в заряде субэндотелиальной части (но не субэндотелиальной) ГБМ, но при этом у них не изменялась фильтрация анионного фикола и не выявлялась протеинурия [91, 92]. Подоцит-специфичный нокаут генов *ext1* [93] и *ndst1* [94], продукты которых необходимы для полимеризации гепарансульфата на протеогликанах, продуцируемых подоцитами, привел к снижению содержания гепарансульфата и плотности анионных сайтов в ГБМ, но вызвал лишь небольшую альбуминурию у животных в возрасте 8 и 18 мес. При мутациях, приводящих к отсутствию сайтов прикрепления ГАГ цепей гепарансульфата в N-терминальном домене перлекана, у мышей нормальны ультраструктура клубочков и заряд ГБМ, а также отсутствуют признаки заболевания почек, но при перегрузке белком наблюдается протеинурия [95]. Таким образом, подоцит-специфичный нокаут ряда генов, необходимых для нормального синтеза протеогликанов и метаболизма ГАГ, у мышей в основном не привел к выраженной протеинурии даже при проведении нагрузочных проб, и приведенные работы вызвали сомнения в справедливости классической концепции о значимости заряда для селективных свойств гломерулярного фильтра [7]. Гепарансульфат-протеогликан

синтезируются не только подоцитами, но и мезангиальными клетками и эндотелием [96, 97], и возможно, что сохранение части анионных сайтов в гломерулярном фильтре предотвращает развитие нарушений.

Учитывая химическую природу компонентов гломерулярного фильтра (высокомолекулярные гидратированные полимеры), все описанные выше подходы не позволяют говорить исключительно о влиянии заряда на проницаемость для белков. Любые модификации протеогликанов и сиалопротеинов изменяют не только заряд, но и сказываются на конформациях молекул и степени их гидратированности, а следовательно, и на эффективном размере пор в гломерулярном фильтре. Можно говорить о том, что в этом случае селективность гломерулярного фильтра в отношении заряда и размера частиц меняются одновременно. Также очевиден дефицит экспериментальных подходов к селективному влиянию на выработку протеогликанов гломерулярным эндотелием для оценки их вклада в итоговый заряд и проницаемость гломерулярного фильтра.

МОДЕЛИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЛОМЕРУЛЯРНОГО ФИЛЬТРА

К настоящему моменту предложено достаточно много различных моделей работы клубочкового фильтра и их модификаций для математического описания механизма ультрафильтрации. Разные модели учитывают различные аспекты функционирования фильтра. Общепринятой модели нет, так как все они имеют ограничения, но в той или иной степени позволяют предсказывать изменения гломерулярной проницаемости для белков при различных физиологических воздействиях и патологиях.

Модель пор предполагает, что гломерулярный барьер построен как пассивный фильтр, содержащий цилиндрические поры определенного диаметра [98]. Математическое описание пор корректировалось по мере появления новых экспериментальных данных. В классической двухпоровой модели предполагаются мелкие и крупные поры фиксированного размера. Разработана модель с мелкими порами, радиус которых имеет логнормальное распределение, и шунтом, т.е. порами бесконечного размера. Наибольшее распространение имеет двухпоровая модель с логнормальным распределением радиуса у многочисленных мелких (4.5–5 нм) и редких крупных пор (7.5–11.5 нм) [99]. Модель гетеропор не включает заряд в качестве отдельного параметра, он учитывается через эффективные размеры пор и фильтрующихся молекул (например, нативный альбумин имеет больший радиус, чем нейтральный альбумин). Модель является полезной и точно описывающей эмпирические данные о фильтрации различных тестовых молекул (альбумин, декс-

траны, фикол), но не дает объяснения механике ультрафильтрации (четко определенные поры в гломерулярном фильтре никто не визуализировал) и противодействия накоплению макромолекул внутри гломерулярного барьера.

Модификацией модели пор является *модель гель-мембрана*, описывающая гломерулярный фильтр как два последовательных барьера: 1) отрицательно заряженный гель, который действует как колонка для ионообменной хроматографии, и 2) гетеропоровая мембрана, обеспечивающая селективность по размеру. Модель предполагает, что в заряженном геле не происходит дискриминации по размеру молекул, а в пористой мембране – нет дискриминации по заряду [100].

Модель гель-проницаемости предполагает, что ГБМ по структуре похожа на гель и почти исключительно определяет проницаемость гломерулярного фильтрационного барьера [101]. Согласно этой модели, диффузия является преобладающим фактором проницаемости альбумина, и она относительно постоянна (не зависит от скорости клубочковой фильтрации). Протеинурия возникает, когда скорость фильтрации воды снижается, в то время как диффузионный поток альбумина в первичный фильтрат остается постоянным. Модель гель-проницаемости не дает объяснения механизму очистки фильтра, а также не объясняет причин возникновения протеинурии при подоцитопатиях или эндотелиальных изменениях.

В рамках *гелевой модели* предполагается, что ГБМ с ее многочисленными фиксированными отрицательными зарядами притягивает значительное количество противоионов, а те в свою очередь воду (электроосмос) [102]. Вследствие этого ГБМ наполняется ионной жидкостью под относительно высоким давлением. Электростатические взаимодействия заставляют макромолекулы ГБМ набухать и перестраиваться в высокоупорядоченную структуру, подобную макромолекулярному кристаллу, с образованием регулярных пор размером около 4 нм. Если заряженные макромолекулы попадают в эту кристаллоподобную структуру, то они выталкивают подвижные противоионы и локально нарушают электронейтральность. Из-за этого фиксированные заряды ГБМ сильнее отталкиваются друг от друга в этом месте, вызывают расхождение волокон и позволяют макромолекулам пройти сквозь фильтр, а не накапливаться внутри [102]. Механизм очистки фильтра за счет проскакивания попавших белков через плотную макромолекулярную сеть ГБМ (порядка 40–60 слоев переплетенных молекул коллагена при толщине мембраны 200–300 нм) не выглядит очень убедительным. Электронно-микроскопические исследования ГБМ у разных видов животных не выявили высокоупорядоченной структуры волокон, предсказываемой гелевой гипотезой [44].

Гель-компрессионная гипотеза. Недавние экспериментальные данные свидетельствуют о том, что сжатие компонентов стенки клубочковых капилляров интактными подоцитами может влиять на размер промежутков в геле ГБМ и, следовательно, на пороговый размер фильтрующихся молекул [103, 104]. В здоровых клубочках сжатие геля может помочь поддерживать примерно постоянный поток фильтрации при изменении фильтрационного давления. Эта гипотеза объясняет механизм протеинурии при подоцитопатиях. Потеря или сглаживание ножек подоцитов позволит ГБМ, которая в этой модели представляется как упругий гель с порами, расширяться по окружности и увеличивать свои поры, что вызовет утечку альбумина в мочу [105].

Электрокинетическая модель предполагает, что в процессе фильтрации в клубочковом барьере генерируется локальное электрическое поле (потенциал потока) [106]. Это происходит вследствие тангенциального движения жидкости, содержащей мелкие ионы (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- и HCO_3^-), вдоль заряженной поверхности фильтра. Поточковый потенциал полярен и влияет на прохождение через гломерулярный фильтр макромолекул, несущих фиксированный электрический заряд. Катионные макромолекулы подвергаются электрофорезу в направлении первичной мочи; анионные макромолекулы (подавляющее большинство белков плазмы) будут отталкиваться от фильтра, а попавшие в него подвергаться электрофорезу обратно в кровь. Накопление в ГБМ относительно небольшой фракции нейтральных частиц может предотвращаться путем их эндоцитоза подоцитами и/или эндотелиальными клетками. Данная модель работы гломерулярного фильтрационного барьера также позволяет объяснить противоречия экспериментальных данных о заряд-селективных свойствах ГБМ, полученных *in vivo* и *in vitro*. При отсутствии условий для генерации потенциала потока не обеспечивается селективность ГБМ в отношении заряженных частиц [106].

Эффективная работа гломерулярного барьера наблюдается, если по всей фильтрующей поверхности устанавливается однородное электрическое поле, и может происходить обратное электрофоретическое движение белков плазмы из структур фильтра. Эпителий капсулы нефрона является потенциальным препятствием для фильтрации и однородной генерации потенциала потока. Покрытие клубочковых капилляров исключительно ножками подоцитов позволяет фильтрации происходить однородно по всей поверхности и способствует установлению гомогенной разности потенциалов. Таким образом, в рамках электрокинетической модели подчеркивается важность уникальной структуры подоцитов. Механизм протеинурии при подоцитопатиях объясняется тем, что тела подоцитов при патологии значительно расширя-

ются и лежат плоско на ГБМ, локально блокируя фильтрацию и нарушая генерацию потенциала потока. В результате коэффициент фильтрации альбумина поднимется до уровня, аналогичного уровню нейтрализованного альбумина (т.е. примерно 0.6% против 0.03%) [106].

DANIO RERIO КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ ГЛОМЕРУЛЯРНОЙ ФИЛЬТРАЦИИ

В последние десятилетия наиболее популярными модельными организмами в исследованиях почек были грызуны. Несмотря на свои многочисленные преимущества, у мышей и крыс отсутствует легкий доступ к клубочкам. Благодаря высокой консервативности строения и функционирования гломерулярного фильтрационного барьера как на клеточном, так и молекулярном уровне, в настоящее время одной из самых часто используемых моделей для изучения развития [107, 108], физиологии [109], патофизиологии гломерул [110], моделирования заболеваний человека [111, 112], тестирования эффектов генетических манипуляций [113, 114], разработки тест-систем для проверки нефротоксических соединений [115] и прочего стала рыбка *Danio rerio*. Личинка рыбки *Danio rerio* является идеальной моделью для исследования почек из-за огромного количества потомков, быстрого развития простой почки (пронефроса) и поразительной гомологии с клубочками млекопитающих [114, 116–118]. Пронефрос рыбки *Danio rerio* состоит из одного клубочка, соединенного с парой канальцев. Фильтрация в пронефросе начинается уже через 2 дня после оплодотворения, фильтрационный барьер с хорошо сформированной ГБМ наблюдается к 72 ч после оплодотворения, к 96 ч быстро увеличивается количество клеток в клубочке, и морфогенез клубочка пронефроса завершается через 120 ч после оплодотворения [107, 108].

Как и у млекопитающих, у рыбок *Danio rerio* он состоит из фенестрированных эндотелиальных клеток, ГБМ и подоцитов [118, 119]. На пронефросе полупрозрачных личинок рыбок *Danio rerio*, экспрессирующих усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP) в подоцитах, продемонстрировано, что в интактном клубочке подоциты представляют собой стационарные клетки, которые не мигрируют и не изменяют структуру ветвления своих основных отростков в течение длительного периода времени [109]. Показано, что у рыбок *Danio rerio* есть истинные гомологи нефрина и подоцина: их экспрессия высокоспецифична для подоцитов и необходима для функционирования пронефроса [59, 113]. В отличие от клубочков мезонефроса взрослых рыб в клубочках пронефроса рыбок *Danio rerio* ГБМ имеет относительно стабильную ширину око-

ло 100–250 нм без расширенного субэндотелиального слоя с перикапиллярными мезангиальными клетками [111, 112], что более сопоставимо с ГБМ млекопитающих.

Благодаря наличию прозрачных линий, экспрессирующих флуоресцентные белки, личинки рыбок *Danio rerio* являются мощным инструментом для прижизненного микроскопического анализа функционирования гломерулярного фильтрационного барьера, например, с помощью длительной двухфотонной микроскопии. В настоящее время используется два основных метода оценки протеинурии у рыбок *Danio rerio* методом флуоресцентной микроскопии: 1) по интенсивности внутрисосудистой флуоресценции инъецированных декстранов, 2) по измерению канальцевого эндоцитоза флуоресцентно меченых декстранов [116]. Недавно была создана и все шире используется трансгенная флуоресцентная линия рыбок *Danio rerio* [Tg(1-fabp:DBP:eGFP)], экспрессирующая витамин D-связывающий белок, сшитый с зеленым флуоресцентным белком [114]. eGFP-DBP (78 кДа), белок семейства альбуминов, синтезируется в печени и секретируется в плазму крови. В физиологических условиях eGFP-DBP за счет своего размера удерживается гломерулярным фильтром в сосудистой сети. При нарушениях фильтрационного барьера описаны наблюдаемое с помощью прижизненной двухфотонной флуоресцентной микроскопии снижение внутрисосудистого eGFP-DBP и усиление мегалин-опосредованного эндоцитоза eGFP-DBP клетками проксимальных канальцев [117]. Также на этой линии рыбок *Danio rerio* предложен косвенный метод оценки дисфункции подоцитов по измерению флуоресценции в сосудистом сплетении сетчатки (“eye assay”) [120].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ряду позвоночных наблюдается тенденция к резкому росту скорости клубочковой фильтрации у наземных позвоночных, особенно птиц и млекопитающих. Приспособлением к усилению фильтрации и обеспечению беспрепятственного прохождения значительного объема воды и растворенных низкомолекулярных веществ являются утончение клубочкового фильтра (прежде всего за счет утончения ГБМ), центральное расположение мезангия и полное исключение клеточных элементов из ГБМ, увеличение числа и упорядоченности фенестр в эндотелии гломерулярных капилляров. При этом структура подоцитов и их специализированных межклеточных контактов практически не претерпела никаких изменений в ходе эволюции позвоночных животных. Это позволяет эффективно изучать механизмы работы подоцитов и моделировать различные патологии почек человека на низших позвоночных (например, рыбка *Danio rerio*). Принципиально, что на всех этапах становления клубоч-

кового фильтрационного барьера он должен не только обеспечивать фильтрацию жидкой части крови в мочевое пространство, но и задерживать форменные элементы крови и белки. С последней задачей клубочковый фильтр достаточно эффективно справляется даже у низших позвоночных. Примечательно, что в отличие от всех других базальных мембран эпителиев только ГБМ содержит структуры с выраженным анионным зарядом. Отрицательный заряд ГБМ характерен для представителей всех изученных классов позвоночных и представляется принципиально важным для функционирования клубочка. Данные проведенного сравнительно-физиологического анализа гломерулярного барьера у разных групп позвоночных в наибольшей степени свидетельствуют о справедливости электрокинетической модели работы фильтра, так как именно она объясняет важность эволюционно консервативной структуры подоцитов и роль совокупности фиксированных отрицательных зарядов в стенке гломерулярного фильтра для предотвращения потери макромолекул (прежде всего белков) из крови при различной интенсивности ультрафильтрации.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00640).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (А.В.К.), сбор данных (А.В.К., Е.В.Б.), написание и редактирование манускрипта (А.В.К., Е.В.Б.), подготовка иллюстраций (А.В.К., Е.В.Б.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Natochin YV* (2019) Principles of evolution of the excretory organs and the system of homeostasis. *J Evol Biochem Phys* 55 (5): 398–410. <https://doi.org/10.1134/S0022093019050077>
2. *Наточин ЮВ* (2019) Почка: орган выделения или сохранения? Усп физиол наук 50 (4): 14–25. [*Natochin YV* (2019) Kidney: excretion or preservation organ? *Usp Fiziol Nauk* 50 (4): 14–25. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S0301179819040064>

3. Yokota SD, Benyajati S, Dantzler WH (1985) Comparative aspects of glomerular filtration in vertebrates. *Ren Physiol* 8 (4–5): 193–221.
<https://doi.org/10.1159/000173055>
4. Kutina AV, Marina AS, Natochin YV (2016) Effects of exenatide on glycemia and renal water and ion excretion differ in frogs and rats. *J Evol Biochem Phys* 52 (3): 228–237.
<https://doi.org/10.1134/S0022093016030054>
5. Haraldsson B, Nystrom J, Deen WM (2008) Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 88 (2): 451–487.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00055.2006>
6. Jarad G, Miner JH (2009) Update on the glomerular filtration barrier. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18 (3): 226–232.
<https://doi.org/10.1097/mnh.0b013e3283296044>
7. Riegel JA (1998) Analysis of fluid dynamics in perfused glomeruli of the hagfish eptatretus stouti (Lockington). *J Exp Biol* 201 (Pt 22): 3097–3104.
<https://doi.org/10.1242/jeb.201.22.3097>
8. Винниченко ЛН (1980) Сравнительная ультраструктура нефрона. Л. Наука. [Vinnichenko LN (1980) Comparative ultrastructure of the nephron. L. Nauka. (In Russ)].
9. Arif E, Nihalani D (2013) Glomerular filtration barrier assembly: an insight. *Postdoc J* 1 (4): 33–45.
10. Gambaryan SP (1994) Microdissectional investigation of the nephrons in some fishes, amphibians, and reptiles inhabiting different environment. *J Morphol* 219 (3): 319–339.
<https://doi.org/10.1002/jmor.1052190311>
11. Orosz SE, Echols MS (2020) The urinary and osmoregulatory systems of birds. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 23 (1): 1–19.
<https://doi.org/10.1016/j.cvex.2019.09.001>
12. Kuhn K, Stolte H, Reale E (1975) The fine structure of the kidney of the hagfish (*Myxine glutinosa* L.): A thin section and freeze-fracture study. *Cell Tissue Res* 164 (2): 201–213.
<https://doi.org/10.1007/BF00218974>
13. Tsuji K, Suleiman H, Miner JH, Daley JM, Capen DE, Paunescu TG, Lu HAJ (2017) Ultrastructural characterization of the glomerulopathy in alport mice by helium ion scanning microscopy (HIM). *Sci Rep* 7 (1): 11696.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-12064-5>
14. Ballermann BJ, Nystrom J, Haraldsson B (2021) The glomerular endothelium restricts albumin filtration. *Front Med (Lausanne)* 8: 766689.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2021.766689>
15. Schaffner A, Rodewald R (1978) Glomerular permeability in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *J Cell Biol* 79 (2 Pt 1): 314–328.
<https://doi.org/10.1083/jcb.79.2.314>
16. Mobjerg N, Jespersen A, Wilkinson M (2004) Morphology of the kidney in the West African caecilian, *Geotrypetes seraphini* (Amphibia, Gymnophiona, Caeciliidae). *J Morphol* 262 (2): 583–607.
<https://doi.org/10.1002/jmor.10244>
17. Tanner GA, Rippe C, Shao Y, Evan AP, Williams JC Jr (2009) Glomerular permeability to macromolecules in the *Necturus* kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 296 (6): F1269–F1278.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00371.2007>
18. Gerth VE, Zhou X, Vize PD (2005) Nephtrin expression and three-dimensional morphogenesis of the *Xenopus* pronephric glomus. *Dev Dyn* 233 (3): 1131–1139.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.20415>
19. Mobjerg N, Larsen EH, Jespersen A (2000) Morphology of the kidney in larvae of *Bufo viridis* (Amphibia, Anura, Bufonidae). *J Morphol* 245 (3): 177–195.
[https://doi.org/10.1002/1097-4687\(200009\)245:3<177::AID-JMOR1>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1097-4687(200009)245:3<177::AID-JMOR1>3.0.CO;2-F)
20. Xu CS, Yang P, Bao HJ, Bian XG, Chen QS (2013) Ultrastructure of the nephron in the soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis* (Reptilia, Chelonia, Trionychidae). *Micron* 44: 451–462.
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.10.00>
21. Tsujii T, Inoue S, Takamiya H, Liszczynsky HR, Naora H, Seno S (1992) Morphology of the kidney of the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*: Monotremata). *Anat Rec* 234 (3): 348–358.
<https://doi.org/10.1002/ar.1092340306>
22. Satchell S (2013) The role of the glomerular endothelium in albumin handling. *Nat Rev Nephrol* 9 (12): 717–725.
<https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.197>
23. Takahashi-Iwanaga H (2015) Three-dimensional micro-anatomy of the pericapillary mesangial tissues in the renal glomerulus: Comparative observations in four vertebrate classes. *Biomed Res* 36 (5): 331–341.
<https://doi.org/10.2220/biomedres.36.331>
24. Squire JM, Chew M, Nneji G, Neal C, Barry J, Michel C (2001) Quasi-periodic substructure in the microvessel endothelial glycocalyx: a possible explanation for molecular filtering? *J Struct Biol* 136 (3): 239–255.
<https://doi.org/10.1006/jsbi.2002.4441>
25. Jeansson M, Haraldsson B (2006) Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol*. 290 (1): F111–F116.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00173.2005>
26. Hegermann J, Lunsdorf H, Ochs M, Haller H (2016) Visualization of the glomerular endothelial glycocalyx by electron microscopy using cationic colloidal thorium dioxide. *Histochem Cell Biol* 145 (1): 41–51.
<https://doi.org/10.1007/s00418-015-1378-3>
27. Fan J, Sun Y, Xia Y, Tarbell JM, Fu BM (2019) Endothelial surface glycocalyx (ESG) components and ultrastructure revealed by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Biorheology* 56 (2–3): 77–88.
<https://doi.org/10.3233/BIR-180204>
28. Muller-Deile J, Gellrich F, Schenk H, Schroder P, Nystrom J, Lorenzen J, Haller H, Schiffer M (2016) Overexpression of TGF- β inducible microRNA-143 in zebrafish leads to impairment of the glomerular filtration barrier by targeting proteoglycans. *Cell Physiol Biochem* 40 (5): 819–830.
<https://doi.org/10.1159/000453142>

29. Bjornson A, Moses J, Ingemansson A, Haraldsson B, Sorensson J (2005) Primary human glomerular endothelial cells produce proteoglycans, and puromycin affects their posttranslational modification. *Am J Physiol Renal Physiol* 288 (4): F748–F756. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00202.2004>
30. Melrose J (2020) Perlecan, a modular instructive proteoglycan with diverse functional properties. *Int J Biochem Cell Biol* 128: 105849. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105849>
31. Jarial MS, Gattone VH, Wilkins JH (2014) Ultrastructural study of the kidney in the coelacanth *Latimeria chalumnae* (Rhypidistia: Coelacanthini). *Zoolog Sci* 31 (5): 283–291. <https://doi.org/10.2108/zs130192>
32. de Ruiter AJ (1980) Changes in glomerular structure after sexual maturation and seawater adaptation in males of the euryhaline teleost *Gasterosteus aculeatus* L. *Cell Tissue Res* 206 (1): 1–20. <https://doi.org/10.1007/BF00233603>
33. Brown JA, Taylor SM, Gray CJ (1983) Glomerular ultrastructure of the trout, *Salmo gairdneri*. Glomerular capillary epithelium and the effects of environmental salinity. *Cell Tissue Res* 230 (1): 205–218. <https://doi.org/10.1007/BF00216040>
34. Ojeda JL, Wong WP, Ip YK, Icardo JM (2008) Renal corpuscle of the african lungfish *Protopterus dolloi*: structural and histochemical modifications during aestivation. *Anat Rec (Hoboken)* 291 (9): 1156–1172. <https://doi.org/10.1002/ar.20729>
35. Reale E, Luciano L, Kühn K, Stolte H, Brod J (1981) Glomerular basement membrane and mesangial matrix: a comparative study in different vertebrates. *Ren Physiol* 4 (2–3): 85–89. <https://doi.org/10.1159/000172810>
36. Decker B, Reale E (1991) The glomerular filtration barrier of the kidney in seven vertebrates classes. Comparative morphological and histochemical observations. *Eur J Basic Appl Histochem* 35 (1): 15–36.
37. Pak Poy RK, Robertson JS (1957) Electron microscopy of the avian renal glomerulus. *J Biophys Biochem Cytol* 3 (2): 183–192. <https://doi.org/10.1083/jcb.3.2.183>
38. Lacy ER, Castellucci M, Reale E (1987) The elasmobranch renal corpuscle: fine structure of Bowman's capsule and the glomerular capillary wall. *Anat Rec* 218 (3): 294–305. <https://doi.org/10.1002/ar.1092180311>
39. Boyd RB, DeVries AL (1983) The seasonal distribution of anionic binding sites in the basement membrane of the kidney glomerulus of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Cell Tissue Res* 234 (2): 271–277. <https://doi.org/10.1007/BF00213768>
40. Ojeda JL, Icardo JM, Wong WP, Ip YK (2006) Microanatomy and ultrastructure of the kidney of the African lungfish *Protopterus dolloi*. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288 (6): 609–625. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20333>
41. Seliverstova EV, Prutskova NP (2017) Tubular protein uptake pattern in the frog model (*Rana temporaria*): The effect of previous protein loading. *J Evol Biochem Physiol* 53 (3): 215–224. <https://doi.org/10.1134/S0022093017030061>
42. Флерова ЕА, Чуйко ГМ (2021) Сравнительная характеристика ультраструктуры клеток нефрона некоторых видов пелагических, придонных и донных рыб (бухта Карантинная, Черное море). *Морск биол журн* 6 (2)6: 95–109. [Flerova EA, Chuyko GM (2021) Comparative characteristics of the ultrastructure of nephron cells in some species of pelagic, epibenthic, and demersal fish (the Karantinnaya bay, the Black Sea). *Morsk biol zhurn* 6 (2)6: 95–109. (In Russ)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2021.06.2.07>
43. Elger M, Hentschel H (1981) The glomerulus of a stenohaline fresh-water teleost, *Carassius auratus gibelio*, adapted to saline water. A scanning and transmission electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 220 (1): 73–85. <https://doi.org/10.1007/BF00209967>
44. Naylor RW, Morais MRPT, Lennon R (2021) Complexities of the glomerular basement membrane. *Nat Rev Nephrol* 17 (2): 112–127. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0329-y>
45. Suh JH, Miner JH (2013) The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. *Nat Rev Nephrol* 9 (8): 470–477. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.109>
46. Marshall CB (2016) Rethinking glomerular basement membrane thickening in diabetic nephropathy: adaptive or pathogenic? *Am J Physiol Renal Physiol* 311 (5): F831–F843. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00313.2016>
47. Suleiman H, Zhang L, Roth R, Heuser JE, Miner JH, Shaw AS, Dani A (2013) Nanoscale protein architecture of the kidney glomerular basement membrane. *eLife* 2: e01149. <https://doi.org/10.7554/eLife.01149>
48. Abrahamson DR (2012) Role of the podocyte (and glomerular endothelium) in building the GBM. *Semin Nephrol* 32 (4): 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2012.06.005>
49. Bersie-Larson LM, Gyoneva L, Goodman DJ, Dorfman KD, Segal Y, Barocas VH (2020) Glomerular filtration and podocyte tensional homeostasis: importance of the minor type IV collagen network. *Biomech Model Mechanobiol* 19 (6): 2433–2442. <https://doi.org/10.1007/s10237-020-01347-y>
50. Harvey SJ, Miner JH (2008) Revisiting the glomerular charge barrier in the molecular era. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17 (4): 393–398. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32830464de>
51. Takahashi-Iwanaga H (2002) Comparative anatomy of the podocyte: A scanning electron microscopic study. *Microsc Res Tech* 57 (4): 196–202. <https://doi.org/10.1002/jemt.10073>
52. Ichimura K, Miyazaki N, Sadayama S, Murata K, Koike M, Nakamura K, Ohta K, Sakai T (2015) Three-dimensional architecture of podocytes revealed by block-

- face scanning electron microscopy. *Sci Rep* 5: 8993. <https://doi.org/10.1038/srep08993>
53. *Burghardt T, Hochapfel F, Salecker B, Meese C, Gröne HJ, Rachel R, Wanner G, Krahn MP, Witzgall R* (2015) Advanced electron microscopic techniques provide a deeper insight into the peculiar features of podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 309 (12): F1082–F1089. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00338.2015>
 54. *Garg P* (2018) A Review of Podocyte Biology. *Am J Nephrol* 47 (Suppl 1): 3–13. <https://doi.org/10.1159/000481633>
 55. *Qu C, Roth R, Puapatanakul P, Loitman C, Hammad D, Genin GM, Miner JH, Suleiman HY* (2022) Three-dimensional visualization of the podocyte actin network using integrated membrane extraction, electron microscopy, and machine learning. *J Am Soc Nephrol* 33 (1): 155–173. <https://doi.org/10.1681/ASN.2021020182>
 56. *Bjornson Granqvist A, Ebefors K, Saleem MA, Mathieson PW, Haraldsson B, Nystrom JS* (2006) Podocyte proteoglycan synthesis is involved in the development of nephrotic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 291 (4): F722–F730. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00433.2005>
 57. *Salmon AH, Neal CR, Harper SJ* (2009) New aspects of glomerular filtration barrier structure and function: five layers (at least) not three. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18 (3): 197–205. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e328329f837>
 58. *Janes DN, Braun EJ* (1997) Urinary protein excretion in red jungle fowl (*Gallus gallus*). *Comp Biochem Physiol* 118: 1273–1275.
 59. *Kramer-Zucker AG, Wiessner S, Jensen AM, Drummond IA* (2005) Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires Nephtrin, Podocin and the FERM domain protein Mosaic eyes. *Dev Biol* 285 (2): 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.06.038>
 60. *Miner JH* (2012) Life without nephrin: it's for the birds. *J Am Soc Nephrol* 23 (3): 369–371. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012010016>
 61. *Yaoita E, Nishimura H, Nameta M, Yoshida Y, Takimoto H, Fujinaka H, Kawachi H, Magdeldin S, Zhang Y, Xu B, Oyama T, Nakamura F, Yamamoto T* (2016) Avian podocytes, which lack nephrin, use adherens junction proteins at intercellular junctions. *J Histochem Cytochem* 64 (1): 67–76. <https://doi.org/10.1369/0022155415611708>
 62. *Lovell PV, Wirthlin M, Wilhelm L, Minx P, Lazar NH, Carbone L, Warren WC, Mello CV* (2014) Conserved syntenic clusters of protein coding genes are missing in birds. *Genome Biol* 15 (12): 565. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0565-1>
 63. *Becherucci F, Mazzinghi B, Provenzano A, Murer L, Giglio S, Romagnani P* (2016) Lessons from genetics: is it time to revise the therapeutic approach to children with steroid-resistant nephrotic syndrome? *J Nephrol* 29 (4): 543–550. <https://doi.org/10.1007/s40620-016-0315-4>
 64. *Wunderlich LCS, Strohl F, Strohl S, Vanderpoorten O, Mascheroni L, Kaminski CF* (2021) Superresolving the kidney – a practical comparison of fluorescence nanoscopy of the glomerular filtration barrier. *Anal Bioanal Chem* 413 (4): 1203–1214. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03084-8>
 65. *Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attie T, Gubler MC, Antignac C* (2002) Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol* 160 (1): 131–139. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64357-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64357-X)
 66. *Haraldsson B, Sorensson J* (2004) Why do we not all have proteinuria? An update of our current understanding of the glomerular barrier. *News Physiol Sci* 19: 7–10. <https://doi.org/10.1152/nips.01461.2003>
 67. *Tsuji T, Naito I, Ukita S, Ono T, Seno S* (1984) The anionic barrier system in the mesonephric renal glomerulus of the arctic lamprey, *Entosphenus japonicus* (Martens) (Cyclostomata). *Cell Tissue Res* 235 (3): 491–496. <https://doi.org/10.1007/BF00226944>
 68. *Tsuji T, Naito I, Ukita S, Ono T, Seno S* (1984) The anionic barrier system on the mesonephric renal glomerulus of the brown hagfish, *Paramyxine atami* Dean (Cyclostomi). *Anat Rec* 208 (3): 337–347. <https://doi.org/10.1002/ar.1092080304>
 69. *Ellis LC, Youson JH* (1991) The anionic charge barrier in the renal corpuscle of the pronephros in the lamprey, *Petromyzon marinus* L. *Anat Rec* 231 (2): 178–184. <https://doi.org/10.1002/ar.1092310205>
 70. *Khalil R, Lalai RA, Wiweger MI, Avramut CM, Koster AJ, Spaink HP, Bruijn JA, Hogendoorn PCW, Baelde JJ* (2019) Glomerular permeability is not affected by heparan sulfate glycosaminoglycan deficiency in zebrafish embryos. *Am J Physiol Renal Physiol* 317 (5): F1211–F1216. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00126.2019>
 71. *More NK* (1977) Mucopolysaccharide heterogeneity of the reptilian kidney basement membranes. *Acta Histochem* 60 (2): 173–179. [https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(77\)80002-0](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(77)80002-0)
 72. *van den Hoven MJ, Wijnhoven TJ, Li JP, Zeharia E, Dijkman HB, Wismans RG, Rops AL, Lensen JF, van den Heuvel LP, van Kuppevelt TH, Vlodaysky I, Berden JH, van der Vlag J* (2008) Reduction of anionic sites in the glomerular basement membrane by heparanase does not lead to proteinuria. *Kidney Int* 73 (3): 278–287. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002706>
 73. *Friden V, Oveland E, Tenstad O, Ebefors K, Nystrom J, Nilsson UA, Haraldsson B* (2011) The glomerular endothelial cell coat is essential for glomerular filtration. *Kidney Int* 79 (12): 1322–1330. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.58>
 74. *van den Born J, van den Heuvel LP, Bakker MA, Veerkamp JH, Assmann KJ, Berden JH* (1992) A monoclonal antibody against GBM heparan sulfate induces an acute selective proteinuria in rats. *Kidney Int* 41 (1): 115–123. <https://doi.org/10.1038/ki.1992.15>
 75. *Gil N, Goldberg R, Neuman T, Garsen M, Zeharia E, Rubinstein AM, van Kuppevelt T, Meirovitz A, Pisano C, Li JP, van der Vlag J, Vlodaysky I, Elkin M* (2012) Heparan sulfate is essential for podocyte survival and glomerular filtration barrier integrity. *J Am Soc Nephrol* 23 (12): 2253–2263. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012070837>

- ranase is essential for the development of diabetic nephropathy in mice. *Diabetes* 61 (1): 208–216. <https://doi.org/10.2337/db11-1024>
76. Schenk H, Masseli A, Schroder P, Bolanos-Palmieri P, Beese M, Hegermann J, Brasen JH, Haller H (2019) Sulfatases, in particular Sulfl, are important for the integrity of the glomerular filtration barrier in zebrafish. *Biomed Res Int* 2019: 4508048. <https://doi.org/10.1155/2019/4508048>
 77. Betteridge KB, Arkill KP, Neal CR, Harper SJ, Foster RR, Satchell SC, Bates DO, Salmon AHJ (2017) Sialic acids regulate microvessel permeability, revealed by novel in vivo studies of endothelial glycocalyx structure and function. *J Physiol* 595 (15): 5015–5035. <https://doi.org/10.1113/JP274167>
 78. Song K, Fu J, Song J, Herzog BH, Bergstrom K, Kondo Y, McDaniel JM, McGee S, Silasi-Mansat R, Lupu F, Chen H, Bagavant H, Xia L (2017) Loss of mucin-type O-glycans impairs the integrity of the glomerular filtration barrier in the mouse kidney. *J Biol Chem* 292 (40): 16491–16497. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.798512>
 79. Weinhold B, Sellmeier M, Schaper W, Blume L, Philippens B, Kats E, Bernard U, Galuska SP, Geyer H, Geyer R, Worthmann K, Schiffer M, Groos S, Gerardy-Schahn R, Munster-Kuhnel AK (2012) Deficits in sialylation impair podocyte maturation. *J Am Soc Nephrol* 23 (8): 1319–1328. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011090947>
 80. Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J, Atasever B, Spaan JA, Ince C, Holleman F, Diamant M, Heine RJ, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES, Vink H (2006) Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* 55 (4): 1127–1132. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.04.06.db05-1619>
 81. Vehaskari VM, Root ER, Germuth FG Jr, Robson AM (1982) Glomerular charge and urinary protein excretion: effects of systemic and intrarenal polycation infusion in the rat. *Kidney Int* 22 (2): 127–135. <https://doi.org/10.1038/ki.1982.144>
 82. Kutina AV, Zakharov VV, Shahmatova EI, Natochin YV (2010) L-NAME-induced heavy proteinuria in healthy rats. *Dokl Biol Sci* 430 (1): 26–28. <https://doi.org/10.1134/s0012496610010096>
 83. Kutina AV, Shakhmatova EI, Natochin YV (2011) Effect of a blocker of nitric oxide production on albumin excretion by rat kidney. *Bull Exp Biol Med* 150 (6): 693–695. <https://doi.org/10.1007/s10517-011-1225-z>
 84. Bolton GR, Deen WM, Daniels BS (1998) Assessment of the charge selectivity of glomerular basement membrane using Ficoll sulfate. *Am J Physiol* 274(5): F889–F896. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1998.274.5.F889>
 85. Salmon AH, Ferguson JK, Burford JL, Gevorgyan H, Nakano D, Harper SJ, Bates DO, Peti-Peterdi J (2012) Loss of the endothelial glycocalyx links albuminuria and vascular dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 23 (8): 1339–1350. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012010017>
 86. Kuwabara A, Satoh M, Tomita N, Sasaki T, Kashihara N (2010) Deterioration of glomerular endothelial surface layer induced by oxidative stress is implicated in altered permeability of macromolecules in Zucker fatty rats. *Diabetologia* 53 (9): 2056–2065. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1810-0>
 87. Jeansson M, Granqvist AB, Nystrom JS, Haraldsson B (2006) Functional and molecular alterations of the glomerular barrier in long-term diabetes in mice. *Diabetologia* 49 (9): 2200–2209. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0319-z>
 88. Jeansson M, Bjorck K, Tenstad O, Haraldsson B (2009) Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 20 (1): 114–122. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007111205>
 89. van den Berg BM, Wang G, Boels MGS, Avramut MC, Jansen E, Sol WMPJ, Lebrin F, van Zonneveld AJ, de Koning EJP, Vink H, Gronhe HJ, Carmeliet P, van der Vlag J, Rabelink TJ (2019) Glomerular Function and Structural Integrity Depend on Hyaluronan Synthesis by Glomerular Endothelium. *J Am Soc Nephrol* 30 (10): 1886–1897. <https://doi.org/10.1681/ASN.2019020192>
 90. Aoki S, Saito-Hakoda A, Yoshikawa T, Shimizu K, Kisu K, Suzuki S, Takagi K, Mizumoto S, Yamada S, van Kuppevelt TH, Yokoyama A, Matsusaka T, Sato H, Ito S, Sugawara A (2018) The reduction of heparan sulphate in the glomerular basement membrane does not augment urinary albumin excretion. *Nephrol Dial Transplant* 33 (1): 26–33. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfx218>
 91. Goldberg S, Harvey SJ, Cunningham J, Tryggvason K, Miner JH (2009) Glomerular filtration is normal in the absence of both agrin and perlecan-heparan sulfate from the glomerular basement membrane. *Nephrol Dial Transplant* 24 (7): 2044–2051. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn758>
 92. Harvey SJ, Jarad G, Cunningham J, Rops AL, van der Vlag J, Berden JH, Moeller MJ, Holzman LB, Burgess RW, Miner JH (2007) Disruption of glomerular basement membrane charge through podocyte-specific mutation of agrin does not alter glomerular permselectivity. *Am J Pathol* 171 (1): 139–152. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.061116>
 93. Chen S, Wassenhove-McCarthy DJ, Yamaguchi Y, Holzman LB, van Kuppevelt TH, Jenniskens GJ, Wijnhoven TJ, Woods AC, McCarthy KJ (2008) Loss of heparan sulfate glycosaminoglycan assembly in podocytes does not lead to proteinuria. *Kidney Int* 74 (3): 289–299. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.159>
 94. Sugar T, Wassenhove-McCarthy DJ, Esko JD, van Kuppevelt TH, Holzman L, McCarthy KJ (2014) Podocyte-specific deletion of NDST1, a key enzyme in the sulfation of heparan sulfate glycosaminoglycans, leads to abnormalities in podocyte organization *in vivo*. *Kidney Int* 85 (2): 307–318. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.281>
 95. Rossi M, Morita H, Sormunen R, Airenne S, Kreivi M, Wang L, Fukai N, Olsen BR, Tryggvason K, Soininen R (2003) Heparan sulfate chains of perlecan are indispensable in the lens capsule but not in the kidney. *EMBO J* 22 (2): 236–245. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg019>
 96. van Det NF, van den Born J, Tamsma JT, Verhagen NA, Berden JH, Bruijn JA, Daha MR, van der Woude FJ (1996) Effects of high glucose on the production of heparan sulfate proteoglycan by mesangial and epithelial cells. *Kidney Int* 49 (4): 1079–1089. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.157>

97. Singh A, Satchell SC, Neal CR, McKenzie EA, Tooke JE, Mathieson PW (2007) Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability. *J Am Soc Nephrol* 18 (11): 2885–2893. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007010119>
98. Moeller MJ, Tenten V (2013) Renal albumin filtration: alternative models to the standard physical barriers. *Nat Rev Nephrol* 9 (5): 266–277. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.58>
99. Oberg CM, Groszek JJ, Roy S, Fissell WH, Rippe B (2018) A distributed solute model: an extended two-pore model with application to the glomerular sieving of Ficoll. *Am J Physiol Renal Physiol* 314(6): F1108–F1116. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00066.2017>
100. Ohlson M, Sorensson J, Haraldsson B (2001) A gel-membrane model of glomerular charge and size selectivity in series. *Am J Physiol Renal Physiol* 280 (3): F396–F405. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.3.F396>
101. Smithies O (2003) Why the kidney glomerulus does not clog: a gel permeation/diffusion hypothesis of renal function. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (7): 4108–4113. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730776100>
102. Wolgast M, Persson AE (2011) The gel hypothesis applied to the rat renal capillary membranes: a review. *Acta Physiol (Oxf)* 202 (4): 617–628. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02277.x>
103. Fissell WH, Miner JH (2018) What Is the Glomerular Ultrafiltration Barrier? *J Am Soc Nephrol* 29 (9): 2262–2264. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018050490>
104. Xu Z, Yue P, Feng JJ (2023) Poroelastic modelling reveals the cooperation between two mechanisms for albuminuria. *J R Soc Interface* 20 (198): 20220634. <https://doi.org/10.1098/rsif.2022.0634>
105. Butt L, Unnersjo-Jess D, Hohne M, Edwards A, Binz-Lotter J, Reilly D, Hahnfeldt R, Ziegler V, Fremter K, Rinschen MM, Helmstadter M, Ebert LK, Castrop H, Hackl MJ, Walz G, Brinkkoetter PT, Liebau MC, Tory K, Hoyer PF, Beck BB, Brismar H, Blom H, Schermer B, Benzing T (2020) A molecular mechanism explaining albuminuria in kidney disease. *Nat Metab* 2 (5): 461–474. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0204-y>
106. Hausmann R, Grepl M, Knecht V, Moeller MJ (2012) The glomerular filtration barrier function: new concepts. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 21 (4): 441–449. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e328354a28e>
107. Drummond IA, Davidson AJ (2010) Zebrafish kidney development. *Methods Cell Biol* 100: 233–260. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384892-5.00009-8>
108. Zhu X, Chen Z, Zeng C, Wang L, Xu F, Hou Q, Liu Z (2016) Ultrastructural characterization of the pronephric glomerulus development in zebrafish. *J Morphol* 277 (8): 1104–1112. <https://doi.org/10.1002/jmor.20560>
109. Endlich N, Simon O, Gopferich A, Wegner H, Moeller MJ, Rumpel E, Kotb AM, Endlich K (2014) Two-photon microscopy reveals stationary podocytes in living zebrafish larvae. *J Am Soc Nephrol* 25 (4): 681–686. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013020178>
110. Kourpa A, Schulz A, Mangelsen E, Kaiser-Graf D, Koppers N, Stoll M, Rothe M, Bader M, Purfürst B, Kunz S, Gladysz T, Niendorf T, Bachmann S, Mutig K, Bolbrinker J, Panakova D, Kreutz R (2023) Studies in zebrafish and rat models support dual blockade of EP2 and EP4 (prostaglandin E₂ receptors type 2 and 4) for renoprotection in glomerular hyperfiltration and albuminuria. *Hypertension* 80 (4): 771–782. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONA-HA.122.20392>
111. Wiggerhauser LM, Metzger L, Bennewitz K, Soleymani S, Boger M, Tabler CT, Hausser I, Sticht C, Wohlfart P, Volk N, Heidenreich E, Buettner M, Hammes HP, Kroll J (2022) Pdx1 knockout leads to a diabetic nephropathy-like phenotype in zebrafish and identifies phosphatidylethanolamine as metabolite promoting early diabetic kidney damage. *Diabetes* 71 (5): 1073–1080. <https://doi.org/10.2337/db21-0645>
112. Zeitler EM, Jennette JC, Flythe JE, Falk RJ, Poulton JS (2022) High-calorie diet results in reversible obesity-related glomerulopathy in adult zebrafish regardless of dietary fat. *Am J Physiol Renal Physiol* 322 (5): F527–F539. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00018.2022>
113. Fukuyo Y, Nakamura T, Bubenshchikova E, Powell R, Tsuji T, Janknecht R, Obara T (2014) Nephritin and Podocin functions are highly conserved between the zebrafish pronephros and mammalian metanephros. *Mol Med Rep* 9 (2): 457–465. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1844>
114. Hanke N, King BL, Vaske B, Haller H, Schiffer M (2015) A Fluorescence-based assay for proteinuria screening in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 12 (5): 372–376. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1093>
115. Rider SA, Bruton FA, Collins RG, Conway BR, Mullins JJ (2018) The Efficacy of puromycin and adriamycin for induction of glomerular failure in larval zebrafish validated by an assay of glomerular permeability dynamics. *Zebrafish* 15 (3): 234–242. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1527>
116. Kotb AM, Muller T, Xie J, Anand-Apte B, Endlich K, Endlich N (2014) Simultaneous assessment of glomerular filtration and barrier function in live zebrafish. *Am J Physiol Renal Physiol* 307 (12): F1427–F1434. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00029.2014>
117. Siegerist F, Zhou W, Endlich K, Endlich N (2017) 4D in vivo imaging of glomerular barrier function in a zebrafish podocyte injury model. *Acta Physiol (Oxf)* 220 (1): 167–173. <https://doi.org/10.1111/apha.12754>
118. Schindler M, Blumenthal A, Moeller MJ, Endlich K, Endlich N (2020) Adriamycin does not damage podocytes of zebrafish larvae. *PLoS One* 15 (11): e0242436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242436>
119. Kolatsi-Joannou M, Osborn D (2020) A Technique for studying glomerular filtration integrity in the zebrafish pronephros. *Methods Mol Biol* 2067: 25–39. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9841-8_3
120. Sopol N, Muller-Deile J (2023) Zebrafish model to study podocyte function within the glomerular filtration barrier. *Methods Mol Biol* 2664: 145–157. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3179-9_11

STRUCTURE AND PROPERTIES OF THE GLOMERULAR FILTRATION BARRIER OF VERTEBRATES: ROLE OF CHARGE FOR FILTERING PROTEINS

E. V. Balbotkina^a and A. V. Kutina^{a,#}

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: kutina_anna@mail.ru*

The renal glomerulus is a unique structure that distinguishes the nephrons of vertebrates from the nephridia of invertebrate animals, providing a direct connection between the circulatory and excretory systems and the most effective control of the composition of the internal environment due to the significant intensification of filtration. The modern ideas about the structure of the glomerular filtration barrier in representatives of all major groups of vertebrates (cyclostomes, fishes, amphibians, reptiles and birds, mammals) were reviewed. Emphasis is placed on the role of the charge of the glomerular barrier structures for its selective properties; approaches to studying the contribution of the anionic components of the renal filter to preventing the loss of plasma proteins are described. The main models of the glomerular filter functioning presented in the literature are considered. Negative charge has been demonstrated to be a distinctive feature of the glomerular filter in all vertebrates. It was shown that a multiple increase of the glomerular filtration rate (from lower vertebrates to birds and mammals) was accompanied by a number of structural changes that ensured the passage of a significant volume of water and dissolved low-molecular substances through the glomerular filter: an increase in the number and ordering of fenestrae in the endothelium of glomerular capillaries, thinning of the glomerular basement membrane and complete exclusion of cellular elements from it. It has been shown that comparative physiological data on the glomerular filter in different groups of vertebrates most strongly confirm the electrokinetic model of the glomerular filtration, since it explains the importance of the evolutionarily conservative structure of podocytes and the role of a set of fixed anionic charges in the filter wall to prevent the loss of macromolecules (primarily proteins) from blood at different intensities of the ultrafiltration.

Keywords: glomerular filtration barrier, charge-selectivity, glomerular basement membrane, podocyte, glycosaminoglycans, glycocalyx, vertebrates