

DOI: 10.7868/S0869813918060151

## КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА РЕАБСОРБЦИИ БЕЛКА НА ФИКСИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТАХ ПОЧКИ

© Н. П. Пруцкова, Е. В. Селивёрстова

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: natprut@yandex.ru

На основе проведенных морфофизиологических исследований обобщены и проанализированы различные способы количественной оценки канальцевой реабсорбции белков в почке крыс и двух видов лягушек.

*Ключевые слова:* почка, реабсорбция белка, проксимальные канальцы, эпителий, флуоресценция, конфокальная микроскопия, анализ изображений.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 6. С. 717—723. 2018

*N. P. Prutskova, E. V. Seliverstova.* QUANTIFICATION OF PROTEIN REABSORPTION ON FIXED PREPARATIONS OF THE KIDNEY. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, St. Petersburg, Russia, e-mail: natprut@yandex.ru.

Based on the performed morphophysiological studies, various quantitative assessment methods of tubular protein reabsorption in the kidney of some representatives of vertebrates were summarized and analyzed.

*Key words:* kidney, protein reabsorption, proximal tubules, epithelium, fluorescence, confocal microscopy, image analysis.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 6. P. 717—723. 2018

Выявление морфологическими методами белка, поступившего в почечные канальцы в результате клубочковой фильтрации, позволяет исследовать характер его реабсорбции в начальных сегментах нефронов и процесс эндоцитоза в отдельных эпителиальных клетках. Изучение морфологических показателей всасывания белка на фиксированных препаратах почки позволяет выяснить закономерности его захвата и накопления в эпителиоцитах проксимальных канальцев (ПК), а также установить достоверные изменения канальцевой реабсорбции белка при различных воздействиях. Для этого используют количественный анализ изображений с последующей статистической обработкой данных. Цель настоящей работы состояла в анализе и обобщении апробированных нами способов количественной оценки канальцевой реабсорбции введенных парентерально белков в почках крыс и лягушек.

## МЕТОДИКА

Внутривенные инъекции различных фильтрующихся белков осуществляли обездвиженным лягушкам и крысам, находящимся под наркозом. Интактным лягушкам — травяной (*Rana temporaria*) и озерной (*Rana ridibunda*) — белки вводили внутривенно или подкожно (в спинной лимфатический мешок). Контролем служило введение растворителя — изоосмотического фосфатно-солевого буфера (PBS). Методы работы соответствовали требованиям регламента использования лабораторных животных в ИЭФБ РАН, принятого и утвержденного ученым советом института 28.01.2016 г. и Комиссией по биоэтике от 05.02.2016 г. (протокол № 11 от 25.02.2016 г.). Морфологические исследования проводили на фиксированных препаратах почек, извлеченных в разные сроки после инъекции. Для изучения реабсорбции флуоресцентных белков (GFP, YFP) и бычьего сывороточного альбумина (BSA), конъюгированного с Alexa-Fluor 488, образцы фиксировали в параформальдегиде с последующим отмыванием, криопротекцией, заключением в криогель, замораживанием в жидком азоте и приготовлением срезов в криостате. Для анализа реабсорбции лизоцима, лактальбумина и выявления в клетках ПК рецепторов эндоцитоза проводили иммуногистохимические реакции на замороженных срезах, используя коммерческие антитела, реактивы и протоколы, аналогичные применявшимся ранее [5, 11, 12, 14]. Препараты анализировали и фотографировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа TCS SL (Leica Microsystems, Германия) или TCS SP5 (Leica Microsystems, Inc., Bannockburn, IL, Германия). Спектры возбуждения для Alexa-fluor, FITC и GFP составили 488 нм, для YFP — 513 нм. Зеленое свечение регистрировали в диапазоне 500—520 нм, свечение YFP — при 560—590 нм (желтая область). Для регистрации свечения GFP, YFP, BSA-конъюгата в зеленой области спектра использовали также флуоресцентный микроскоп Biozero (BZ-8100E, Keyence Corporation, Япония) с фильтром OP-66835 BZ FILTER GFP. Изображения получали, используя объективы 63x и 40x и электронное масштабирование. Для анализа изображений и статистики пользовались пакетами программ Image Tool III, Image J, Microsoft Office Excell 2003 и 2010, Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Визуальный анализ изображений показал, что в процессе всасывания белка интенсивность специфической флуоресценции, характер свечения (диффузный или гранулярный), а также распределение регистрируемого сигнала в различных частях ПК и отдельных эпителиоцитах варьируют в зависимости от дозы белка, способа введения и времени после инъекции. Отдельные примеры получаемых изображений представлены на рис. 1, А. Использовано несколько изложенных ниже подходов к выбору и анализу изучаемых показателей и их количественной оценке.

На изображениях, полученных при идентичных параметрах работы микроскопа, определяли величину свечения (оптическую плотность) в выделенной области — эпителиальном пласте профиля ПК (в условных единицах, соответствующих градациям серого цвета от 0 до 255). Величину специфической флуоресценции рассчитывали как разность между средними значениями флуоресценции после введения белка и автофлуоресценции в контроле с соответствующей ошибкой разности [1, 12]. Установлена высокая положительная корреляция между свечением GFP в почках лягушек и логарифмом дозы этого белка в пределах доз от 2.3 до 113 мкг/100 г массы тела [12]. Аналогичная зависимость была выявлена при расчетах средних значений флуоресценции GFP и средних максимумов свечения этого белка у крыс [4, 12]. Данный способ оценки был также использован для доказательства всасывания GFP в тонкой кишке и его последующего поступ-

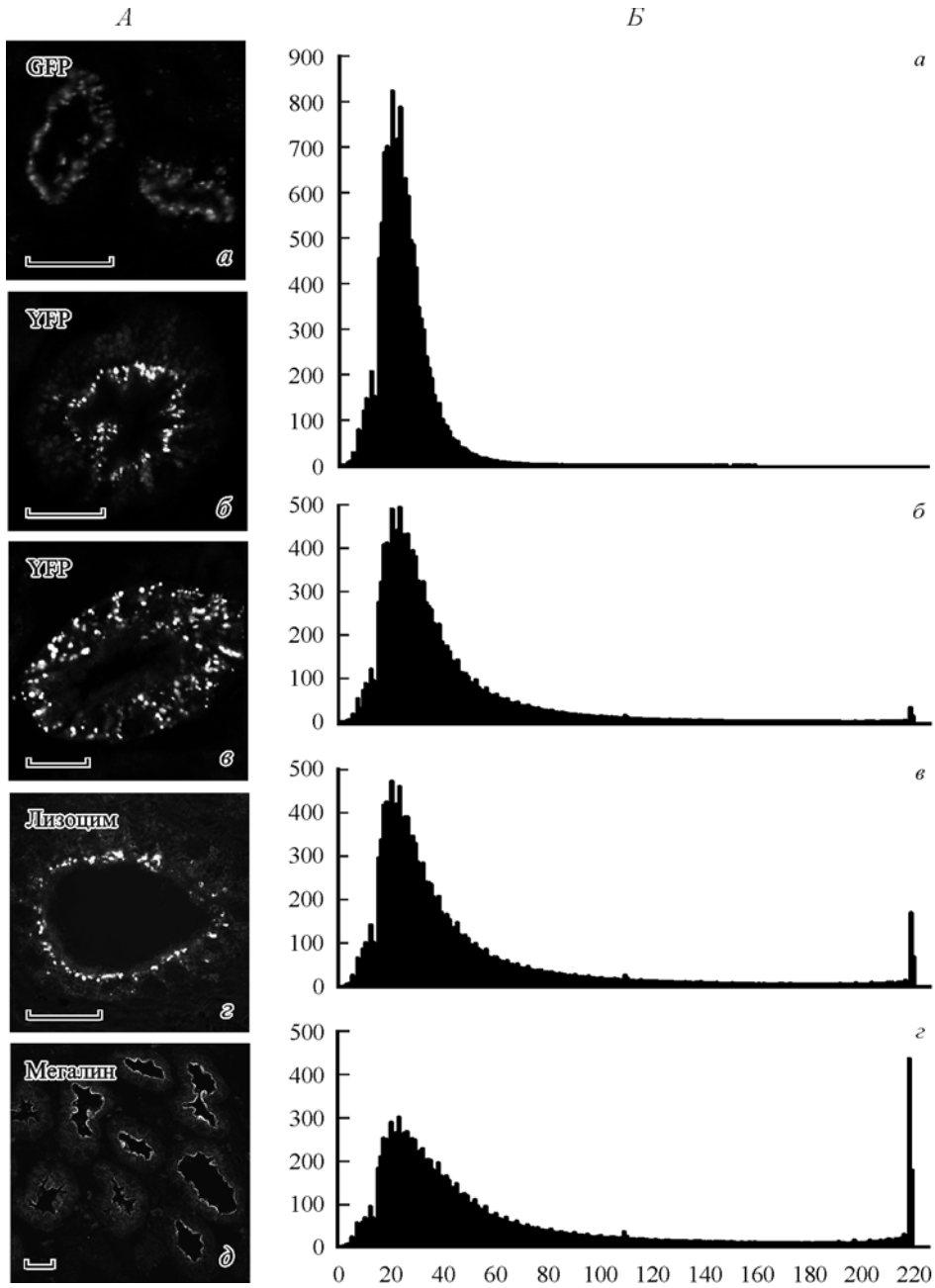


Рис. 1. Флуоресценция белков в эпителии проксимальных канальцев (ПК) почки.

*A* — изображения профилей ПК в срезах почки крысы (*a*), травяных лягушек (*б–г*) и озерной лягушки (*д*): *a, б* — свечение флуоресцентных белков, преимущественно диффузное через 5 мин после инъекции (*a*) и локализованное в апикальных эндоцитозных везикулах через 30 мин (*б*), *в* — накопление флуоресцентных везикул в цитоплазме эпителиальных клеток через 60 мин; *г* — везикулы с иммуномеченным лизоцимом в апикальной цитоплазме через 30 мин; *д* — профили ПК с меткой к мегалину. Масштаб: 20 мкм. *Б* — распределение элементов изображения в эпителии отдельных ПК по интенсивности свечения в спектре GFP у травяных лягушек: *a* — в контроле; *б–г* — после инъекции GFP в дозе 11, 23 и 113 мкг/100 г массы тела соответственно. По оси ординат — число пикселей (в % к выделенной области); по оси абсцисс — оптическая плотность, усл. ед.

ления в почку у крыс и лягушек [4, 7]. В отсутствие контрольных вариантов (без введения белка) и при выраженном гранулярном характере свечения меченых белков используют скорректированную интенсивность флуоресценции. При ее расчете из измеренной интенсивности эпителиального пласта ПК вычитается фоновая интенсивность, которую измеряют в базальной части эпителия, не содержащей эндоцитозных везикул с белком в ранние сроки после инъекций [15]. В качестве примера усложненного варианта таких измерений можно привести определение средних значений скорректированной интенсивности флуоресценции ретинол-связывающего белка в срезах почки мыши [10]. В данном случае эти показатели измеряли отдельно в апикальной и базальной половинках эпителиального слоя ПК с последующим расчетом их соотношения при различных условиях эксперимента.

Отмечено, что с увеличением дозы белка диффузный характер свечения постепенно сменяется гранулярным. При этом в эпителии ПК почки лягушки в контроле (без введения белка) распределение относительного числа элементов изображения (пикселей) в зависимости от интенсивности фоновой флуоресценции приближается к нормальному. Среднее значение интенсивности в фоне (в спектре GFP) составило в наших опытах  $23 \pm 2$  усл. ед. (500 ПК, 5 лягушек). На примере распределения фоновой флуоресценции в одиночном профиле ПК видно, что этой величине соответствуют максимумы, присутствующие на гистограмме в области низких значений интенсивности (рис. 1, Б, а). После введения белка и с увеличением его количества пики на гистограммах уменьшаются, распределение смещается в сторону увеличения интенсивности сигнала. Гистограммы становятся бимодальными, с появлением второго пика в области высоких значений (рис. 1, Б, б—г), что обусловлено накоплением белка в везикулах и увеличением числа светящихся везикул в клетках ПК. При введении небольших количеств GFP стало очевидным, что содержащие белок внутриклеточные везикулы занимают лишь незначительную часть площади эпителиального пласта канальца. Это обстоятельство затрудняло выявление достоверных изменений расчетной величины специфической флуоресценции в эпителии ПК при изменении условий опытов и различных воздействиях. Поэтому был применен расчет плотности специфической флуоресценции. Этот показатель определяли как относительное количество элементов изображения с интенсивностью флуоресценции, выходящей за пределы нормального распределения флуоресценции в контроле (превышавшей  $M + 3\sigma$ , где  $M$  — среднее значение автофлуоресценции, а  $\sigma$  — стандартное отклонение). Внедрение данного показателя (в % к площади эпителиального пласта канальца) явилось убедительным свидетельством всасывания GFP в почках лягушек и крыс при его введении в концентрации от 0.13 до 1.26 нмоль/100 мкл. Расчет плотности специфической флуоресценции GFP в ПК у лягушек позволил установить негативное модулирующее влияние антидиуретического гормона амфибий аргинин-вазотоцина (АВТ) на фильтрацию и реабсорбцию этого белка [1, 12], а у крыс — выявить признаки катаболизма GFP в почке через 2 ч по сравнению с 0.5 ч после инъекции [12].

В процессе фильтрации белка и его продвижения по ходу ПК наблюдается постепенное увеличение в срезах почки числа профилей ПК с абсорбированным белком. Определение этого показателя существенно для анализа реабсорбции белка у полуводных лягушек, поскольку для них характерна перемежающаяся и зависящая от гормонального статуса активность почечных клубочков. Подсчет числа флуоресцентных профилей (в процентах к общему числу профилей ПК в срезе или на отдельных изображениях, а также в процентах к среднему количеству клубочков в срезах почки) наряду с плотностью флуоресценции оказался весьма эффективным индикатором эффектов АВТ на всасывание GFP и YFP (рис. 2, А), а также блокирования действия гормона антагонистом V1-рецепторов (рис. 2, Б). Было установлено, что всасывание белков в эпителии ПК у лягушек происходит по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза с участием в

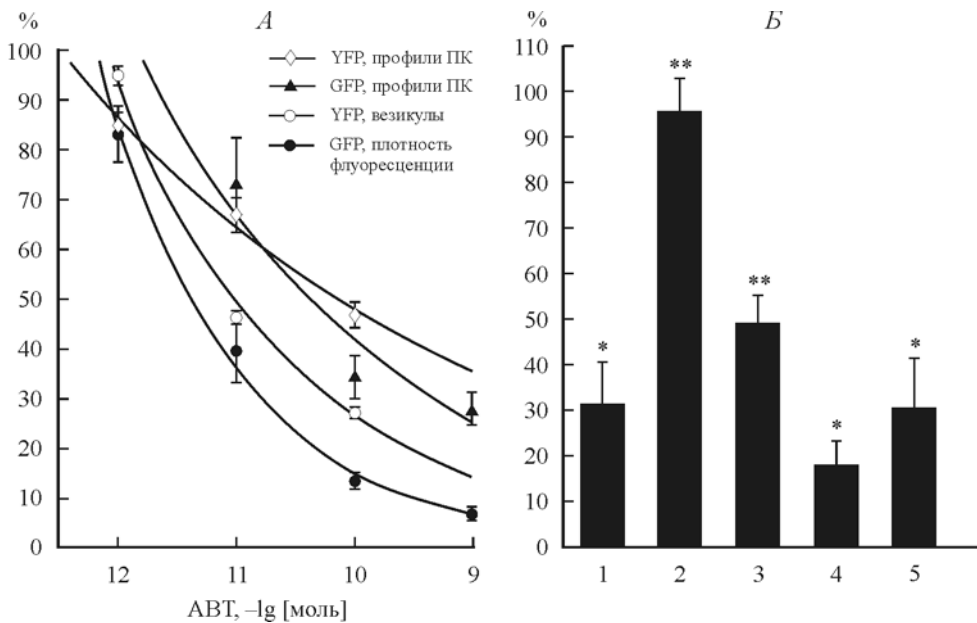


Рис. 2. Эффект аргинин-вазотоцина (А) и антагониста V1-рецепторов (Б) на реабсорбцию флуоресцентных белков в почке травяной лягушки.

А — снижение реабсорбции с увеличением дозы аргинин-вазотоцина (АВТ). По оси ординат — показатели реабсорбции (в % к GFP- или YFP-контролю) через 30 мин после внутривенной инъекции GFP и 1 ч после подкожного введения YFP; по оси абсцисс — доза АВТ, -lg [моль]/30 г массы тела, введенного подкожно за 20 мин до инъекции белка; Б — повышение реабсорбции GFP (1—3) и YFP (4—5) при введении V1-антагониста (0.01—1 нмоль) за 10 мин до АВТ (0.001—0.1 нмоль); по оси ординат — увеличение числа флуоресцентных профилей ПК (1—4) и эндоцитозных везикул (5) со свечением белков (Δ, в % к контролю). Достоверность различий: \*  $p < 0.05$  и \*\*  $p < 0.01$  по сравнению с действием АВТ.

захвате и интернализации исследуемых белков мультилигандных рецепторов — мегалина и кубилина [7, 11, 14], как это осуществляется в почке млекопитающих [8]. В результате иммуномечения рецепторов в контроле и после введения лизоцима оказалось, что регистрируемый сигнал для конститутивных рецепторов эндоцитоза (присутствующих в почке лягушек, которым не вводили экзогенный белок) в большинстве случаев был слабее и выявлялся реже по сравнению с таковым после инъекции лизоцима. Для подтверждения различий на примере мегалина сигналы в апикальной зоне эпителиоцитов разделяли по интенсивности (в диапазоне средних значений оптической плотности 1—7 усл. ед. и более при сигнале в фоне менее 1) и подсчитывали число ПК со слабым и более интенсивным сигналом. Пример иммунодетекции мегалина в ПК и различий в интенсивности сигнала представлен на изображении среза почки (рис. 1, А, д). Количество ПК с интенсивной меткой к мегалину после введения лизоцима зимующим травяным лягушкам составило  $67 \pm 2\%$ , достоверно превышая их число в контроле ( $p < 0.001$ ) — после введения PBS ( $41 \pm 2\%$ ) или у интактных лягушек ( $30 \pm 2\%$ ). Установленные различия отражают характер экспрессии и/или активности эндоцитозных рецепторов. Для проверки эффекта АВТ на захват лизоцима в почках озерных лягушек проведено двойное иммуномечение лизоцима и эндоцитозного рецептора, при котором мегалин рассматривали в качестве маркера ПК. Показано, что лизоцим всасывался в эпителиоцитах маркированных ПК и был частично колокализован с рецептором. При расчете количества профилей ПК с меткой к лизоциму относительно числа канальцев, иммунопозитивных к

мегалину, установлено статистически достоверное снижение реабсорбции лизоцима на  $27 \pm 2\%$  ( $p < 0.001$ ) после инъекций АВТ в дозе 3.3 нмоль/100 г массы тела.

В процессе эндоцитоза белок из просвета ПК поступает в эндоцитозные везикулы. Подсчет среднего числа содержащих белок флуоресцентных везикул диаметром 0.3—1 мкм (в расчете на 5 соседних клеток профиля ПК) оказался адекватным и стабильным морфологическим показателем абсорбционной емкости клеток за фиксированные периоды времени [3]. Это дало возможность, независимо от способа идентификации введенного белка, установить, что у лягушек различные низкомолекулярные белки всасываются в почке с примерно одинаковой скоростью, которая выше по сравнению с БСА [5], но значительно ниже по сравнению с абсорбцией GFP в почке у крыс [2]. Определение количества содержащих белок везикул дало возможность изучить динамику процесса реабсорбции, реализующегося *in vivo* [2], проследить внутриклеточный трафик интернализованного белка и его аккумуляцию в отдельных эпителиоцитах [11, 14]. Это также позволило охарактеризовать абсорбционную емкость клеток ПК при конкурентном всасывании разных низкомолекулярных белков [3, 11] и в условиях предварительной белковой нагрузки [6]. Данный показатель был использован в сочетании с определением числа профилей ПК, в которых был обнаружен введенный лягушкам БСА. Показано, что при различиях в скорости образования эндоцитозных везикул при внутривенном и подкожном введении БСА число светящихся профилей ПК одинаково [5]. Это явилось свидетельством стабильности процесса клубочковой фильтрации и продвижения профильтрованного белка по ходу канальцев у травяных и озерных лягушек в условиях гидратации, когда отсутствуют стимулы к повышению секреции антидиуретического гормона. Сходный показатель эндоцитоза альбумина (среднее число светящихся кластеров в расчете на клетку) используют в опытах *in vitro*, в частности на культуре клеток почки опоссума [9].

В целом можно заключить, что при проведении морфофизиологических исследований важен выбор анализируемых показателей в зависимости от изучаемого объекта, задач эксперимента, использованных методов микроскопии и иммуногистохимии. Статистический анализ результатов проведенных исследований с применением различных подходов к количественной оценке результата реабсорбции фильтрующихся белков на получаемых изображениях является необходимым этапом изучения основных закономерностей реабсорбции белка в почке и молекулярных механизмов эндоцитоза.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012290371-3) при частичной поддержке РФФИ (проект № 16-04-00465). Исследования методом конфокальной микроскопии проведены на базе ЦКП ИЭФБ РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Пруцкова Н. П. Фильтрация и реабсорбция зеленого флуоресцентного белка в почке лягушки *Rana temporaria*: эффект аргинин-вазотоцина. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 47(1) : 54—61. 2011.

[2] Пруцкова Н. П., Кутина А. В. Сравнительный анализ реабсорбции флуоресцентных белков в почках лягушки и крысы. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 51(3) : 221—224. 2015.

[3] Пруцкова Н. П., Селивёрстова Е. В. Влияние различных белков на реабсорбцию желтого флуоресцентного белка в почке травяной лягушки. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 52(3) : 221—225. 2016.

[4] Пруцкова Н. П., Селивёрстова Е. В. Всасывание зеленого флуоресцентного белка клетками проксимальных канальцев почки крысы и накопление в них при увеличении его поступления в кровь. Морфология. 135(2) : 53—57. 2009.



- [5] Пруцкова Н. П., Селивёрстова Е. В. Реабсорбция альбумина и других фильтрующихся белков в почках амфибий. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 103(12) : 1395—1404. 2017.
- [6] Селивёрстова Е. В., Пруцкова Н. П. Паттерн канальцевой реабсорбции белка в модельном организме лягушки (*Rana temporaria*): эффект предварительной белковой нагрузки. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 53(3) : 192—200. 2017.
- [7] Селивёрстова Е. В., Пруцкова Н. П. Реабсорбция желтого флюоресцентного белка в почке *Rana temporaria* путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 50(6) : 454—462. 2014.
- [8] Christensen E. I., Birn H., Storm T., Weyer K., Nielsen R. Endocytic receptors in the renal proximal tubule. Physiology (Bethesda). 27 : 223—236. 2012.
- [9] Hryciw D. H., Ekberg J., Ferguson C., Lee A., Wang D., Parton R. G., Pollock C. A., Yun C. C., Poronnik P. Regulation of albumin endocytosis by PSD95/Dlg/ZO-1 (PDZ) Scaffolds. Interaction of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange regulatory factor-2 with CIC5. J. Biol. Chem. 281(23) : 16 068—16 077. 2006.
- [10] Lee D., Gleich K., Fraser S. A., Katerelos M., Mount P. F., Power D. A. Limited capacity of proximal tubular proteolysis in mice with proteinuria. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 304 : F1009—F1019. 2013.
- [11] Prutskova N. P., Seliverstova E. V. Absorption capacity of renal proximal tubular cells studied by combined injections of YFP and GFP in *Rana temporaria* L. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 166 : 138—146. 2013.
- [12] Prutskova N. P., Seliverstova E. V. Tubular GFP uptake pattern in the rat and frog kidneys. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 160 : 175—183. 2011.
- [13] Seliverstova E. V., Burmakin M. V., Natochin Yu. V. Renal clearance of absorbed intact GFP in the frog and rat intestine. Comp. Biochem. Physiol. A. 147 : 1067—1073. 2007.
- [14] Seliverstova E. V., Prutskova N. P. Receptor-mediated endocytosis of lysozyme in renal proximal tubules of the frog *Rana temporaria*. Eur. J. Histochem. 59 : 79—86. 2015.
- [15] Wartosch L., Fuhrmann J. C., Schweizer M., Stauber T., Jentsch T. J. Lysosomal degradation of endocytosed proteins depends on the chloride transport protein CIC-7. FASEB J. 23 : 4056—4068. 2009.

Поступила 17 IV 2018