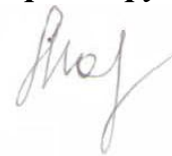


На правах рукописи



Моросанова Мария Александровна

**Механизмы повреждения клеток эпителия почечных канальцев
при моделировании пиелонефрита *in vitro***

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА

2013

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Пиелонефрит – это инфекционное заболевание, которое характеризуется воспалительным повреждением почки и приводит к ее дисфункции. При этом не только присутствие бактерий и продуктов их жизнедеятельности, но и излишняя, вызванная этими продуктами активация иммунной системы являются причинами такого повреждения [1]. Более того, многие другие заболевания почки, даже не связанные с инфекцией, часто приводят к развитию воспаления в почечной ткани [2]. Воспалительное повреждение, в конечном итоге, приводит к гибели клеток функциональной ткани. При пиелонефрите поражаются многие ткани почки. Гибель эпителиальных клеток почечных канальцев при пиелонефрите приводит к развитию почечной недостаточности. Все это указывает на необходимость изучения клеточных процессов, лежащих в основе воспалительного повреждения клеток эпителия почечных канальцев при пиелонефрите.

Исследование клеточных процессов затруднено в классических моделях *in vivo*. Рассмотрение роли эпителиальных клеток в отдельности очень важно для понимания воспалительного процесса, так как в последнее время появляется все больше данных о важности этой роли в воспалении [3,4]. Сложностью моделей *in vivo*, в частности, является то, что использование ингибиторов ферментов и рецепторов может вызвать множественный ответ со стороны различных систем организма, что затрудняет интерпретацию результата [5]. Таким образом, для того, чтобы максимально подробно рассмотреть процессы, протекающие в клетках почечного эпителия, используют модели *in vitro*, которые предполагают использование клеточных культур почечного эпителия [6]. Модели воспаления *in vitro*, описанные в литературе, представляют собой либо культивирование лейкоцитов с антигенами [7,8], либо культивирование клеток почечного эпителия с антигенами или провоспалительными цитокинами [9,10]. Есть пример совместного культивирования клеток почечного эпителия и Т-лимфоцитов [11].

В диссертации предложено использовать *in vitro* модель воспалительного повреждения клеток эпителия почечных канальцев, заключающуюся в сокультивировании этих клеток с мононуклеарными лейкоцитами и бактериальным лизатом. В этой системе моделируются те процессы, которые приводят к повреждению почечных канальцев при пиелонефрите. С использованием такой модели можно исследовать механизмы активации клеток почечного эпителия и лейкоцитов при воздействии бактериальных молекул, механизмы повреждения клеток эпителия почечных канальцев под действием провоспалительного окружения и способы предотвращения такого повреждения.

Цели и задачи исследования

Целью работы было исследование механизмов воспалительного повреждения клеток эпителия почечных канальцев при пиелонефрите и поиск стратегий их защиты.

Задачи исследования:

1. Создать *in vitro* модель воспалительного процесса в почечных канальцах при пиелонефрите.
2. Изучить механизмы развития окислительного стресса и гибели клеток эпителия почечных канальцев при моделировании воспалительного процесса *in vitro*.
3. Изучить механизмы сигнализации через Toll-подобные рецепторы и синтеза провоспалительных цитокинов в модели воспалительного процесса при сокультивировании клеток почечного эпителия, мононуклеарных лейкоцитов и бактериального лизата.
4. Определить роль межклеточных взаимодействий при развитии модельного воспаления.
5. Исследовать изменения, происходящие в митохондриях клеток эпителия почечных канальцев при моделировании воспаления *in vitro*.

Научная новизна работы

Предложена *in vitro* модель воспалительного повреждения клеток эпителия почечных канальцев (ЭПК). Предложенная модель заключается в сокультивировании клеток ЭПК, мононуклеарных лейкоцитов и бактериального лизата. Эта система позволяет моделировать процесс повреждения клеток ЭПК в почках при пиелонефрите. В модельной системе наблюдаются такие характеристики воспаления, как окислительный стресс, увеличение синтеза провоспалительных цитокинов, гибель клеток ЭПК и мононуклеарных лейкоцитов.

Получены результаты, которые описывают реакцию клеток почечного эпителия на присутствие антигенов, лигандов Toll-подобных рецепторов и провоспалительных цитокинов. Эта реакция опосредуется, в частности, сигнализацией через Toll-подобные рецепторы клеток ЭПК. В результате такой активации ЭПК также синтезируют провоспалительные цитокины (TNF α , IL-6, IL-1 α). Впервые показано накопление ядерной формы IL-1 α в ядрах ЭПК при действии провоспалительного окружения, а также увеличение степени ацетилирования белков ядра.

Показана важная роль митохондрий клеток ЭПК в развитии окислительного стресса, а также фрагментация митохондрий под воздействием провоспалительного окружения. Впервые для клеток ЭПК показано увеличение активности ММП-9 в митохондриях при моделировании воспаления, а также при действии митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQR1.

Возможные субстраты этого фермента найдены среди митохондриальных белков с помощью биоинформатических методов, что позволяет предположить защитную функцию увеличения активности ММП-9.

Продемонстрированы возможности *in vitro* модели для скрининга потенциальных защитных веществ на примере трех защитных веществ с различными механизмами действия (растворимый антиоксидант Trolox, митохондриально-адресованный антиоксидант SkQR1, ионы лития). Предложенная модель позволила проверить влияние этих веществ на уровень окислительного стресса, число погибших клеток, синтез провоспалительных цитокинов. Отмечена разница в действии традиционного антиоксиданта и митохондриально-направленных агентов.

Научно-практическое значение работы

Результаты данной работы расширяют представления об участии клеток ЭПК в процессе развития воспалительного ответа при пиелонефрите, а также о механизмах воспалительного повреждения клеток ЭПК. Показано активное участие клеток ЭПК в распознавании компонентов бактериальных клеток с помощью Toll-подобных рецепторов и в синтезе провоспалительных цитокинов. Продемонстрирована важная роль митохондрий клеток ЭПК в развитии окислительного стресса и повреждении клеток ЭПК. Выявление механизмов такого повреждения позволит предложить новые способы защиты клеток ЭПК при пиелонефрите.

Предложенная модель *in vitro* сокультивирования клеток ЭПК, мононуклеарных лейкоцитов и бактериального лизата открывает перспективы для скрининга потенциальных защитных веществ с целью выяснения их эффективности для защиты клеток ЭПК от воспалительного повреждения. Исследуя различные параметры воспалительного процесса (уровень окислительного стресса, уровень клеточной гибели, концентрация провоспалительных цитокинов), можно наблюдать различия в действии веществ с разными функциональными особенностями и делать выводы об их применимости для защиты клеток эпителия почечных канальцев.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При сокультивировании клеток первичной культуры эпителия почечных канальцев с мононуклеарными лейкоцитами и бактериальным лизатом наблюдается повышение уровня содержания АФК и NO в клетках эпителия почечных канальцев, увеличение концентрации нитрат-ионов в среде, гибель лейкоцитов и клеток эпителия почечных канальцев.
2. При сокультивировании клеток первичной культуры эпителия почечных канальцев с мононуклеарными лейкоцитами и бактериальным лизатом отмечено увеличение уровня синтеза провоспалительных цитокинов: накопление TNF α и IL-6 в среде, IL-1 α в ядрах клеток почечного эпителия.

Активация TLR4 и TLR2 на поверхности клеток эпителия почечных канальцев и лейкоцитов приводит к увеличению уровня синтеза провоспалительных цитокинов; ингибирование TLR4 на поверхности клеток эпителия почечных канальцев и лейкоцитов приводит к снижению уровня синтеза провоспалительных цитокинов.

3. При сокультивировании клеток первичной культуры эпителия почечных канальцев с моноклеарными лейкоцитами и бактериальным лизатом при разделении двух типов клеток мембраной с порами 0,4 мкм наблюдается снижение содержания АФК в клетках эпителия почечных канальцев и концентрации TNF α в среде.

4. Преинкубация клеток первичной культуры эпителия почечных канальцев с Trolox, SkQR1 и LiCl и присутствие этих веществ в среде при сокультивировании с моноклеарными лейкоцитами и бактериальным лизатом позволяет снизить уровень АФК в клетках эпителия почечных канальцев, концентрацию нитрат-ионов в среде, содержание IL-1 α в ядрах клеток эпителия почечных канальцев, степень ацетилирования белков ядер клеток эпителия почечных канальцев и количество погибших клеток эпителия почечных канальцев. Митохондриально-направленные агенты SkQR1 и LiCl значительно лучше защищают клетки эпителия почечных канальцев от гибели, чем Trolox.

5. В митохондриях клеток эпителия почечных канальцев увеличивается активность матриксной металлопротеиназы-9 при сокультивировании их с моноклеарными лейкоцитами и лизатом, присутствие SkQR1 приводит к дополнительному увеличению этой активности. Также SkQR1 приводит к увеличению содержания антиапоптотического белка bcl-2 в митохондриях клеток эпителия почечных канальцев.

Апробация работы и публикации

Основное содержание работы изложено в 18 работах. Апробация работы была проведена на открытом семинаре отдела биоэнергетики Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ (председатель - академик РАН В.П.Скулачев). Результаты исследований докладывались на международных и российских конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2009» (Москва, 2009), XXIII Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2011), II Международная научно-практическая конференция "Достижения, инновационные направления, перспективы развития и проблемы современной медицинской науки, генетики и биотехнологий" (Екатеринбург, 2011), конгрессе 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress (Севилья, Испания, 2012), конгрессе 49th ERA-EDTA Congress (Париж, Франция, 2012), конгрессе 50th ERA-EDTA Congress (Стамбул,

Турция, 2013), Международная конференция "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация" (Пушино, 2013).

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, раздела «материалы и методы», результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Материал диссертации изложен на 120 страницах, содержит 71 рисунок и 2 таблицы, в списке цитируемой литературы 126 наименований.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 18 научных работ, в том числе 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 1 патент и 10 тезисов конференций.

Материалы и методы исследования

1. Моделирование пиелонефрита in vitro

Получение первичной культуры эпителия почечных канальцев из почки крысы

Почки 1-3 дневных крысят извлекались в стерильных условиях, ткань диссоциировали 0,5% раствором коллагеназы. Полученную суспензию центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. Осадок ресуспендировали в ~10 мл среды DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной сыворотки (FBS), осаждали недиссоциированные куски ткани, а супернатант переносили в другую пробирку. Через 10 минут осаждались почечные канальцы, а отдельные клетки оставались в растворе. Осадок почечных канальцев ресуспендировали в DMEM/F12/FBS и сажали на 24-луночные планшеты или на покровные стекла в чашках Петри диаметром 35мм.

Получение бактериального лизата

Бактерии *E.coli* штамма №85 (из коллекции кафедры микробиологии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова) выращивали на жидкой питательной среде следующего состава: 1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт и 1% хлорида натрия. Среду, содержащую примерно 10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ) в мл, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Для получения лизата бактерий брали осадок от 30 мл ночной культуры и разводили его в 3 мл физиологического раствора (0,9% NaCl). Полученную суспензию автоклавировали 1,5 ч при 120°C и использовали для добавления в культуральную среду почечного эпителия.

Получение мононуклеарных лейкоцитов периферической крови

Кровь получали из яремной вены взрослых самцов крыс с добавлением 1000 Ед гепарина. 5 мл гепаринизированной крови медленно наслаивали на 5 мл фиколла-урографина плотностью 1,077 г/см³, после этого центрифугировали 30 минут при 2000 об/мин. Собирали мононуклеарную фракцию лейкоцитов, переносили в другую пробирку и центрифугировали 5 минут при 2000 об/мин.

Для лизирования оставшихся эритроцитов полученный осадок ресуспендировали в 10 мл охлажденного гипотонического раствора (0,88% раствора NH_4Cl) и инкубировали в течение 10 мин, затем центрифугировали в течение 5 мин при 2000 об/мин. Полученный осадок лейкоцитов суспендировали в 5 мл DMEM/F12. После этого с помощью камеры Горяева-Тома подсчитывали концентрацию клеток и разводили средой DMEM/F12 до концентрации ~100 тыс. клеток в мл.

Сокультивирование клеток и обработка различными веществами

Клеткам ЭПК через 2 дня после выделения среду с сывороткой заменяли на DMEM/F12. Для исследования действия защитных веществ в некоторые лунки (чашки) вместо среды DMEM/F12 добавляли различные тестируемые вещества, разведенные на DMEM/F12: LiCl (9 мМ), SkQ1 (10 нМ), Trolox (100 мкМ), SkQR1 (10 нМ). Клетки инкубировали с этими веществами в течение 2 часов. Перед последующими этапами моделирования отмывание защитных агентов, как правило, не проводилось. В некоторых экспериментах проводили такое отмывание путем трехкратной смены среды DMEM/F12, затем добавляли к клеткам ЭПК лейкоциты в среде DMEM/F12 и бактериальный лизат, а в контрольных пробах к клеткам добавляли среду DMEM/F12. Клетки ЭПК, лейкоциты и бактериальный лизат сокультивировали в течение 24 или 48 часов.

В некоторых экспериментах вместо бактериального лизата добавляли к клеткам ЭПК бактериальный липополисахарид (ЛПС) (5 мкг/мл), формилпептид (5 мкМ), агонисты TLR2: зимозан (100 мкг/мл) и PAM3CSK4 (10 мкг/мл), либо бактериальный лизат различной степени разбавления (на фосфатном буфере). Для ингибирования сигнализации через TLR4 часть среды DMEM/F12, равную объему раствора антигена, заменяли на раствор антагонистов TLR4 на среде DMEM/F12: полимиксин В (1 мг/мл), LPS-RS (5 мкг/мл). Для изучения влияния пространственного разделения клеток в лунки 24-луночного планшета с культурой клеток почечного эпителия вставляли специальные пластиковые вкладыши, дно которых представляет собой мембрану с порами 0,4 мкм. Среду, содержащую лейкоциты, помещали внутрь вкладыша, а бактериальный лизат добавляли в лунку и во вкладыш.

2. Определение продукции активных форм кислорода (АФК) и NO

Для оценки продукции АФК и NO флуоресцентные зонды разводили в среде DMEM/F12 без бикарбоната: 2,7-DCF DA (10 мкМ), DAF-2 DA (10 мкМ). Добавляли к клеткам ЭПК и инкубировали при 37°C 15 минут. После этого зонды отмывали и добавляли DMEM/F12 без бикарбоната. Флуоресценцию зондов регистрировали при исследовании клеточных культур на конфокальном микроскопе.

Для ингибирования ферментов, участвующих в синтезе АФК и NO, клетки ЭПК и лейкоциты преинкубировали в течение 30 минут с дифениленйодонием (DPI, 0,5 мкМ) и метиловым эфиром L-нитроаргинаина (LNAME, 5нМ).

3. Оценка гибели клеток ЭПК

Для оценки гибели клеток ЭПК их окрашивали аннексином V, конъюгированным с ФИТЦ. К клеткам ЭПК добавляли 200 мкл буфера и 2 мкл аннексина V-ФИТЦ (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Sigma, США) в каждую лунку 24-луночного планшета. Инкубировали 15 минут при 25°C, после чего клетки фиксировали (4% формалин, 4°C, 30мин), пермеабилizовали (0,2% Triton X-100, 4°C, 1 час) и окрашивали пропидий йодидом (50 мкг/мл, 500 мкл на лунку, 25 мин). При такой процедуре пропидий йодидом окрашивались все клетки, что было использовано для подсчета их общего числа.

4. Определение TNF α в среде

Среду, полученную после 24-часового культивирования, центрифугировали 5 минут при 2000 об/мин. Концентрацию TNF α в супернатанте определяли с помощью тест-набора TNF α ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience, San Diego, CA, США).

5. Иммуоцитохимия

Клетки ЭПК фиксировали 4% раствором формалина на PBS в течение 30 мин при 4°C, промывали раствором PBS, пермеабилizовали 0,2% Triton X-100 на PBS в течение 60 мин при 4°C, затем промывали раствором PBS и блокировали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) на PBS в течение 60 мин при 25°C. Затем клетки ЭПК инкубировали с первичными антителами в течение 2 часов при 25°C (разведения на 1% BSA на PBS: антитела к белку Тамма-Хорсфалла 1:100, антитела к TLR2 1:200, антитела к IL-6 1:100, антитела к IL-1 α 1:100, антитела к ацетилированным белкам 1:200). Затем клетки 3 раза отмывали с 1% BSA на PBS и инкубировали со вторичными антителами в течение 1 часа при 25°C (разведение 1:100). После этого клетки 3 раза отмывали 1% BSA на PBS. Клетки в лунках заливали 1% BSA на PBS, клетки на стеклах заключали в 50% раствор глицерина на PBS на предметных стеклах и закрепляли лаком.

6. Иммуноблоттинг и зимография образцов митохондрий клеток ЭПК

Концентрация белка определялась по методу, основанному на колориметрической реакции бицинхониновой кислоты с белками. Концентрация белка в анализируемом образце определялась по калибровочной кривой, в качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовался коммерческий препарат BSA.

Активность ММП определяли с помощью зимографии, которую проводили в 10% полиакриламидном геле, содержащем 0,2% раствор желатина. По окончании электрофореза гель промывали дважды по 15 мин в ренатурирующем буфере (Invitrogen, США), затем промывали в течение 15 мин в активирующем буфере (Invitrogen, США), после чего инкубировали в течение

ночи при 37°C в активирующем буфере. Гель фиксировали, красили раствором Кумасси R-250 и промывали. Активность ММП проявлялась в виде светлых полос на темном фоне, плотность которых оценивалась с помощью программного обеспечения WCIF ImageJ (NIH, Bethesda, MD, США).

Электрофорез белков для последующего вестерн-блоттинга проводили в псевдоградиентном (10-20% полиакриламидном) геле в денатурирующих условиях по Laemmli. По окончании электрофореза переносили белки на PVDF мембрану. Мембрану блокировали, промывали и инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами (к IL-6, bcl-2, ММП-9 и VDAC). Мембраны промывали и инкубировали 1,5 ч при 25°C с вторичными антикроличьими антителами. Мембраны промывали, специфические полосы детектировали с помощью хемилюминесцентного субстрата ECL Advance Western blotting detection kit. Хемилюминесценцию регистрировали с помощью фотопленки (Kodak, США). Изображение оцифровывали на сканере V100 Photo (Epson, Япония) и анализировали с помощью программного обеспечения WCIF ImageJ (NIH, Bethesda, MD, США).

7. Конфокальная микроскопия

Микроскопическое исследование клеток производили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM510 (Carl Zeiss, Германия) с фирменным программным обеспечением Zeiss LSM Image Browser (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Германия). Для возбуждения флуоресценции использовали аргоновый лазер (полоса излучения 488 нм) и HeNe лазер (полоса излучения 543 нм). Флуоресценцию регистрировали в диапазоне 505-530 нм (для вторичных антител, конъюгированных с ФИТЦ, для DAF, DCF и GFP) и 560-590 нм (для вторичных антител, конъюгированных с Alexa, для TMRE). Толщина конфокальной плоскости составляла около 1,5 мкм (pinhole 150 мкм).

Обработка изображений, полученных с помощью конфокального микроскопа, проводилась с помощью программного обеспечения WCIF ImageJ (NIH, Bethesda, MD, США).

8. Статистика

Все эксперименты повторялись минимум в 3 повторах, при микроскопии оценивалось не менее 10 полей зрения для каждого повтора. Полученные результаты представлены в виде: среднее \pm стандартная ошибка среднего. Сравнение между группами проводилось с помощью t-критерия Стьюдента. Статистическая значимость приведена для $p < 0,01$, если не указано иное.

Результаты исследования

Характеристики воспалительного процесса в предложенной модели

В разработанной модели воспалительного повреждения клеток ЭПК *in vitro* показано возрастание флуоресценции DCF, то есть увеличение концентрации АФК (рис. 1а, б) при 24-часовом культивировании клеток ЭПК с лейкоцитами и лизатом. Культивирование клеток ЭПК с бактериальным лизатом приводит к увеличению флуоресценции DCF, однако сокультивирование клеток ЭПК с бактериальным лизатом и мононуклеарными лейкоцитами приводит к еще большему возрастанию флуоресценции. Использование защитных веществ (Trolox, SkQ1, SkQR1, LiCl) позволяет значительно снизить уровень АФК в клетках ЭПК (рис. 1в). Предполагается следующая схема развития окислительного стресса: АФК производятся лейкоцитами и клетками ЭПК в ответ на антигенную стимуляцию, и последующее повышение уровня АФК в клетках может запускать самоусиливающиеся каскады с участием митохондрий (АФК-индуцированное образование АФК, [12]).

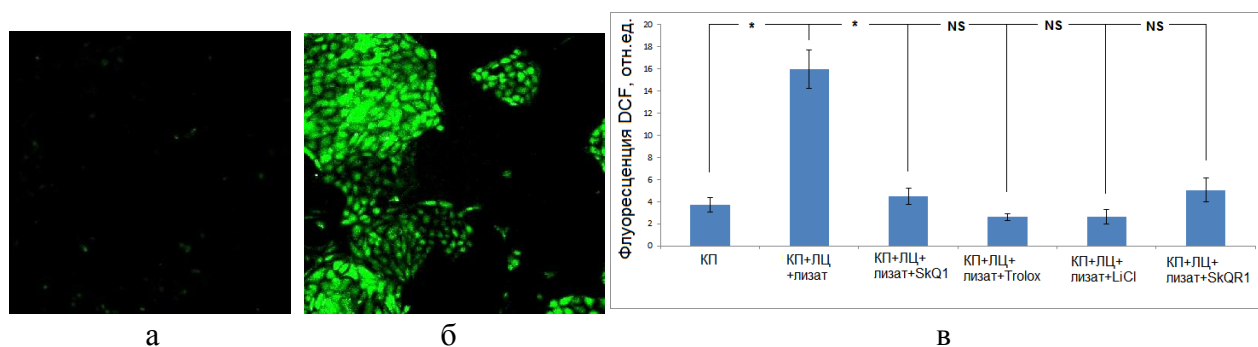


Рис. 1. Флуоресценция зонда на АФК при моделировании воспаления *in vitro*. а – контроль, б – сокультивирование клеток ЭПК с лейкоцитами и лизатом, в – снижение уровня АФК в клетках ЭПК (КП) при действии защитных веществ. * - $p < 0,01$, NS — нет отличия.

В модели воспалительного повреждения клеток ЭПК *in vitro* наблюдается накопление нитрат-ионов в среде, как конечного продукта окисления NO и других активных форм азота (рис. 2а), что свидетельствует о развитии нитрозильного стресса, наряду с окислительным. Концентрация нитрат-ионов в среде возрастает при культивировании клеток ЭПК с бактериальным лизатом, и в еще большей степени она возрастает при сокультивировании клеток ЭПК с лейкоцитами и бактериальным лизатом. По крайней мере, часть NO производится NO-синтазой мононуклеарных лейкоцитов и клеток ЭПК, так как использование ингибитора этого фермента приводит к снижению количества нитрат-ионов в среде. Защитные вещества SkQR1, LiCl и Trolox также снижают содержание нитрат-ионов в среде (рис.2б). Вероятно, индуцируемая NO-синтаза клеток ЭПК и лейкоцитов может активироваться в зависимости от уровня окислительного стресса.

В предложенной модели показана гибель клеток ЭПК после инкубации с активированными мононуклеарными лейкоцитами, развивающаяся в течение 48

часов (увеличение числа аннексин-положительных клеток, рис. 3а, б). Гибель клеток ЭПК в большой степени обусловлена окислительным стрессом и, в некоторой степени, нитрозильным стрессом (рис. 3б). Специфические митохондриальные защитные агенты лучше защищают клетки ЭПК от гибели, чем традиционный антиоксидант Trolox. Вероятно, именно повреждение митохондрий является критическим для гибели клеток ЭПК.

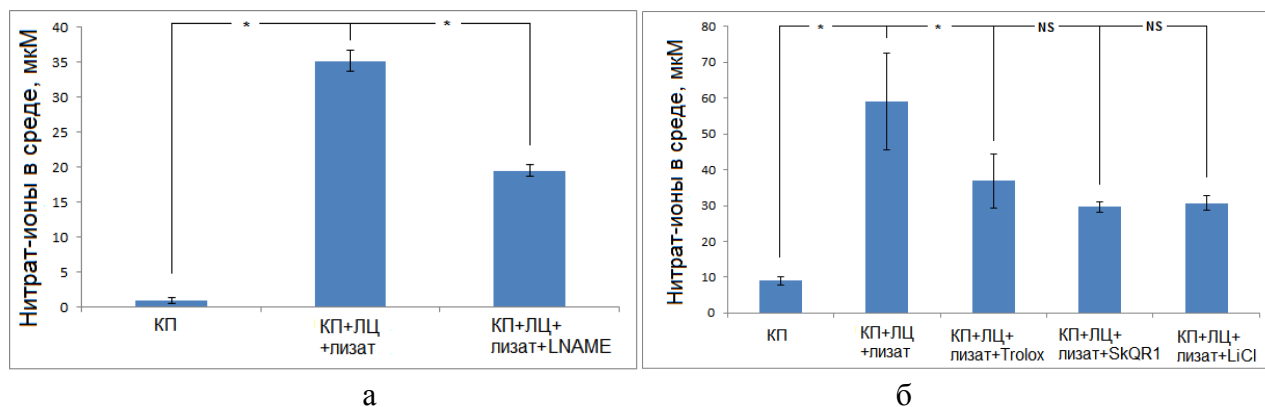


Рис. 2. Концентрация нитрат-ионов в среде при моделировании воспаления *in vitro*. а – ингибитор NO-синтазы LNAME снижает содержание нитрат-ионов в среде, б – защитные вещества снижают уровень нитрат-ионов в среде. * - $p < 0,01$, NS — нет отличия.

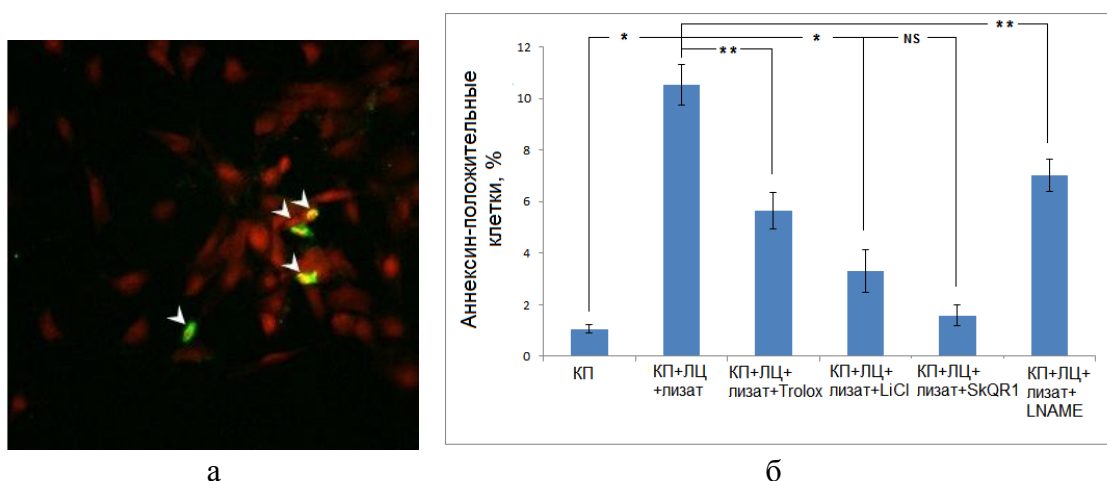


Рис. 3. Гибель клеток ЭПК при сокультивировании клеток ЭПК с мононуклеарными лейкоцитами и лизатом. а - аннексин-положительные клетки ЭПК, б – защитные вещества и ингибитор NO-синтазы защищают клетки ЭПК от гибели. * - $p < 0,01$, ** - $p < 0,05$, NS — нет отличия.

Мононуклеарные лейкоциты также погибают в условиях моделирования воспаления. При культивировании таких лейкоцитов с бактериальным лизатом (все концентрации аналогичны использованному в случае сокультивирования лейкоцитов и клеток ЭПК) в отсутствие клеток ЭПК через 24 часа все лейкоциты погибают (нет отличий от негативного контроля). При этом ни одно из использованных защитных веществ не позволило защитить лейкоциты от гибели. Для того чтобы изучить гибель мононуклеарных лейкоцитов в условиях сокультивирования с клетками ЭПК, были использованы лейкоциты

трансгенных мышей, несущие GFP. По флуоресценции этого белка можно определять наличие содержащих его лейкоцитов в сокультуре (рис. 4а, б). При сокультивировании мононуклеарных лейкоцитов и клеток ЭПК в присутствии бактериального лизата число живых лейкоцитов снижается примерно в 2 раза по сравнению с сокультивированием без лизата (рис. 4в).

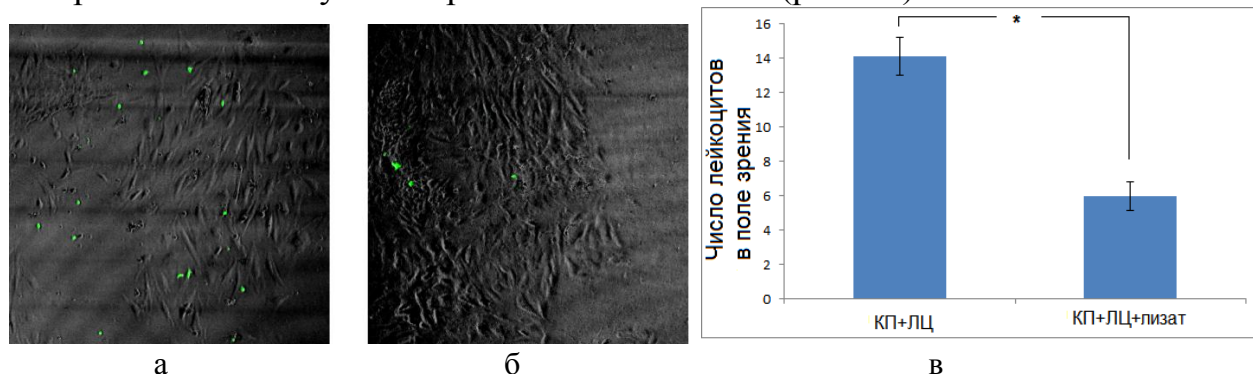


Рис. 4. Гибель лейкоцитов под действием лизата. а - сокультивирование мононуклеарных лейкоцитов и клеток ЭПК, б - сокультивирование мононуклеарных лейкоцитов и клеток ЭПК в присутствии лизата, отдельные лейкоциты заметны лишь в окружении клеток ЭПК, в - среднее число живых лейкоцитов, содержащих флуоресцирующий белок GFP, в поле зрения микроскопа. * - $p < 0,01$.

Механизмы развития модельного воспалительного процесса

Известно, что за распознавание различных антигенов иммунными клетками отвечают Toll-подобные рецепторы. Активация TLR4 клеток ЭПК и мононуклеарных лейкоцитов ЛПС приводит к увеличению уровня окислительного стресса в клетках ЭПК и к увеличению концентрации TNF α в среде (рис. 5). Использование антагонистов этого рецептора – полимиксина и LPS_RS (ЛПС непатогенной бактерии) – позволяет снизить содержание TNF α в среде (рис. 5б). Однако LPS_RS приводит к снижению уровня окислительного стресса, а полимиксин, наоборот, повышает этот уровень, вероятно, за счет собственной нефротоксичности (рис. 5а).

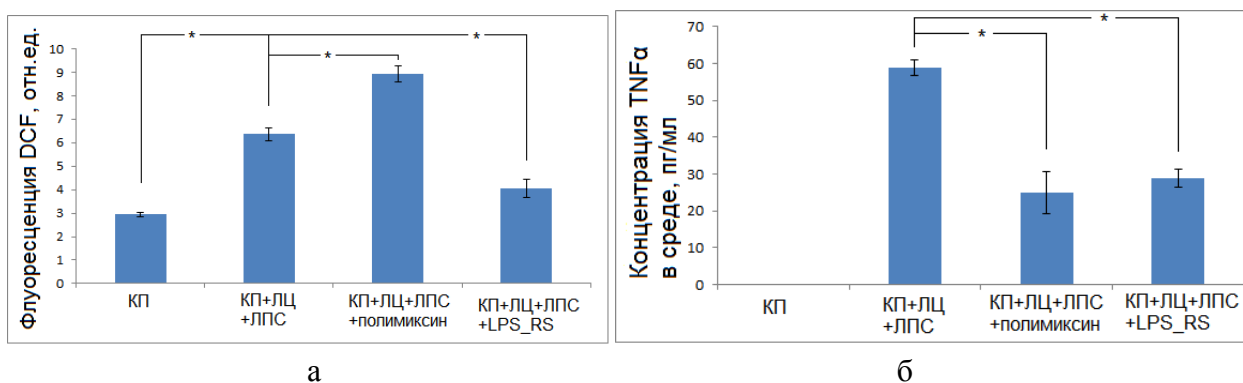


Рис. 5. Изменение уровня окислительного стресса (а) и концентрации TNF α (б) при сокультивировании клеток ЭПК с мононуклеарными лейкоцитами и ЛПС, а также действие антагонистов TLR4. * - $p < 0,01$.

Активация TLR2 с помощью его агонистов – PAM3CSK4 и зимозана – также приводит к увеличению уровня окислительного стресса в клетках ЭПК и к увеличению концентрации TNF α в среде (рис. 6). Таковую активацию можно наблюдать на культуре клеток ЭПК, однако при воздействии агонистов на совместную культуру клеток ЭПК и мононуклеарных лейкоцитов возможно еще большее увеличение этой активации. Важно отметить, что эти данные указывают на то, что TLR2 клеток ЭПК участвует в распознавании антигенов, что позволяет этим клеткам самостоятельно производить провоспалительные цитокины, а значит, принимать участие в воспалительном ответе.

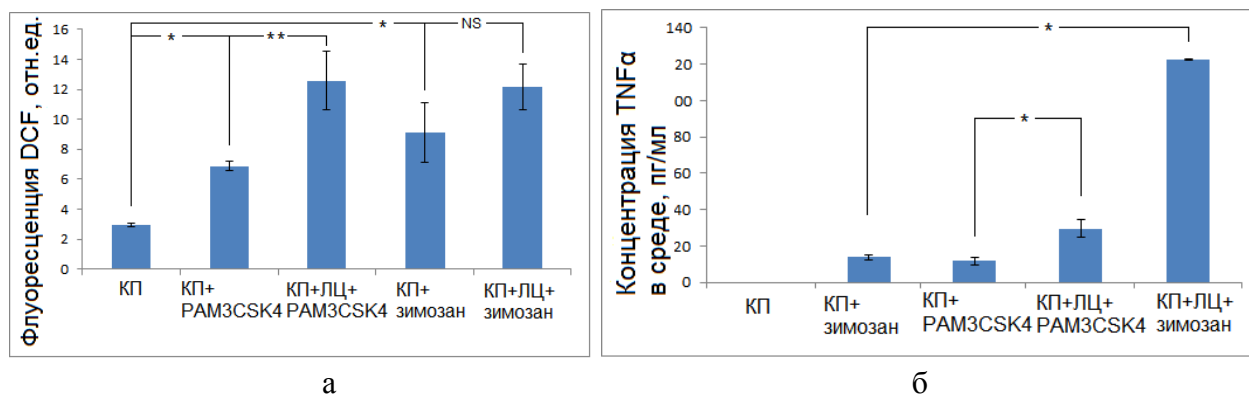


Рис. 6. Изменение уровня окислительного стресса (а) и концентрации TNF α (б) при сокультивировании клеток ЭПК с мононуклеарными лейкоцитами и агонистами TLR2 и при культивировании клеток ЭПК с агонистами TLR2. * - $p < 0,01$, ** - $p < 0,05$, NS — нет отличия.

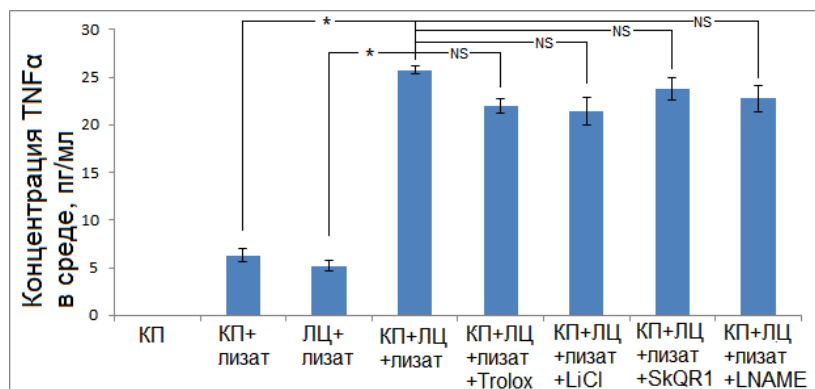


Рис. 7. Концентрация TNF α в среде при культивировании клеток ЭПК с лизатом, лейкоцитов с лизатом, а также при сокультивировании клеток ЭПК с мононуклеарными лейкоцитами и бактериальным лизатом в присутствии различных защитных веществ. * - $p < 0,01$, NS — нет отличия.

При сокультивировании клеток ЭПК с мононуклеарными лейкоцитами и лизатом, так же, как и в случае с ЛПС, наблюдается рост концентрации провоспалительного цитокина TNF α . При культивировании с бактериальным лизатом, как лейкоциты, так и клетки ЭПК могут синтезировать и выделять в среду этот цитокин (рис. 7). Суммарная концентрация TNF α в среде через 24 часа сокультивирования клеток ЭПК, мононуклеарных лейкоцитов и бактериального лизата намного выше, чем сумма концентраций этого цитокина,

синтезированного клетками по отдельности. Присутствие защитных веществ не влияет на синтез TNF α (рис. 7).

В предложенной модели воспалительного повреждения клеток ЭПК также были отмечены высокие значения провоспалительного цитокина IL-6 в клетках ЭПК (рис. 8а). Присутствие полимиксина в среде культивирования приводит к снижению содержания IL-6 в клетках ЭПК. Аналогичным образом полимиксин снижает содержание этого цитокина в среде культивирования (рис 8б).

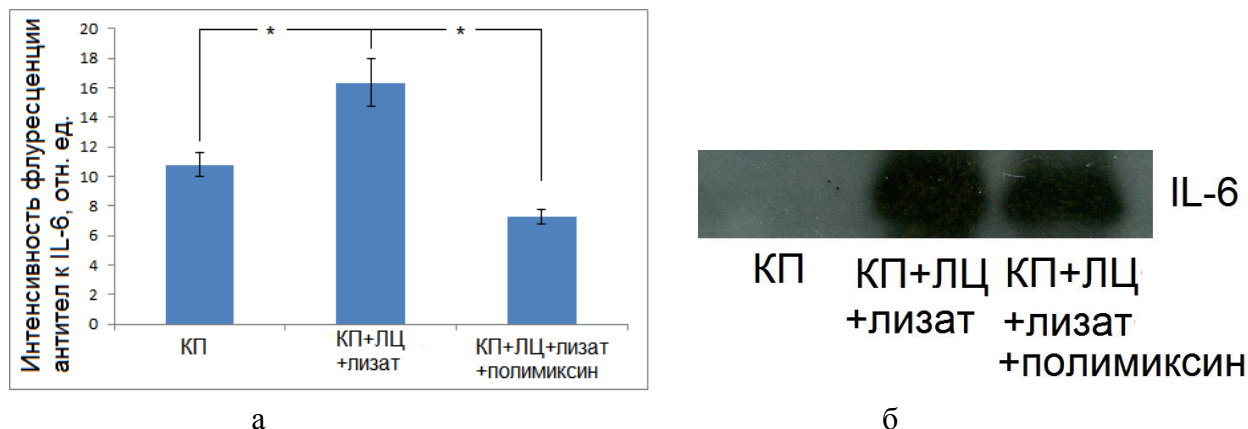


Рис. 8. Увеличение содержания IL-6 в клетках ЭПК (КП) и в среде культивирования при сокультивировании клеток ЭПК с мононуклеарными лейкоцитами (ЛЦ) и лизатом. а – полимиксин снижает содержание IL-6 в клетках ЭПК, б – иммуноблот, показывающий содержание IL-6 в среде. * - $p < 0,01$.

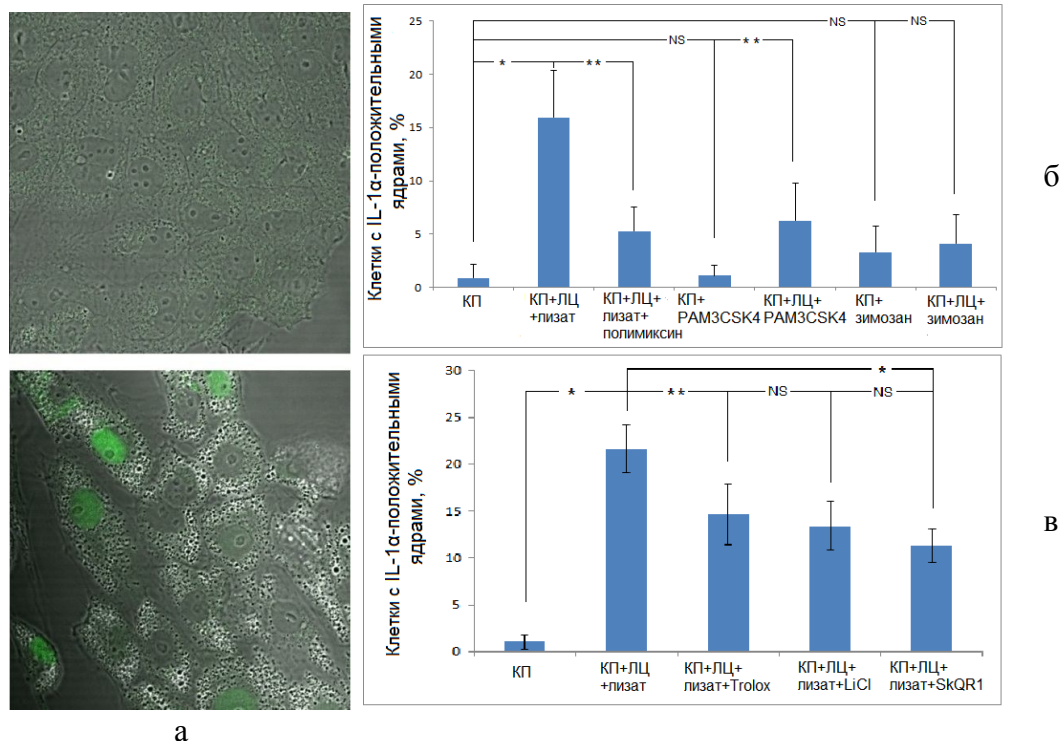


Рис. 9. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток ЭПК антителами к IL-1 α . а – контрольная культура (вверху) и культура ЭПК после 24-часового сокультивирования с мононуклеарными лейкоцитами и лизатом (внизу), б – активация TLR приводит к увеличению синтеза IL-1 α , в – защитные вещества приводят к снижению уровня синтеза IL-1 α . * - $p < 0,01$, ** - $p < 0,05$, NS — нет отличия.

При иммуноцитохимическом исследовании содержания цитокина IL-1 α в клетках ЭПК при сокультивировании с лейкоцитами и лизатом было отмечено окрашивание ядер клеток ЭПК (рис. 9а). Клетки с IL-1 α -положительными ядрами были обнаружены только при моделировании воспаления (при действии бактериального лизата, ЛПС или агонистов TLR2) (рис. 9а, б), при этом в контрольной культуре такие клетки практически отсутствовали. Содержание этого цитокина в ядрах также снижается при действии защитных веществ (рис. 9в). Таким образом, активация Toll-подобных рецепторов и АФК приводят к повышению уровня синтеза IL-1 α и накоплению его в ядрах клеток.

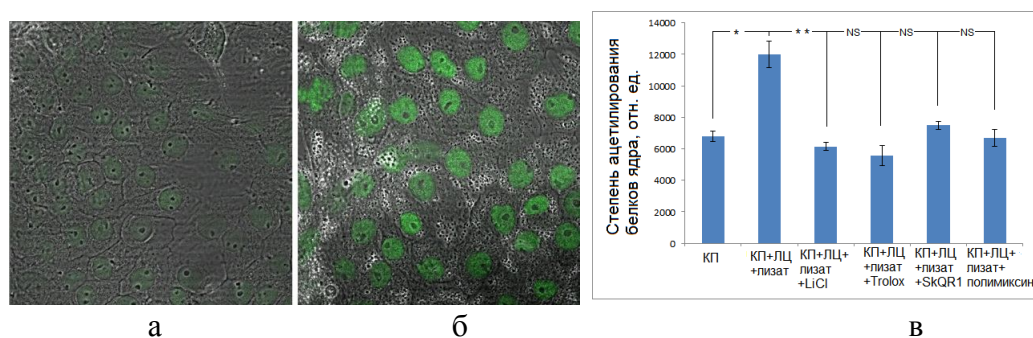


Рис. 10. Иммуноцитохимическое окрашивание культуры ЭПК FITC-мечеными антителами к ацетилированным белкам. а – контрольная культура, б – культура ЭПК после сокультивирования с лейкоцитами и лизатом, в – защитные вещества и полимиксин снижают степень ацетилирования белков ядра. * - $p < 0,01$, ** - $p < 0,05$, NS — нет отличия.

Некоторые из описанных выше результатов свидетельствуют о наличии взаимодействия клеток ЭПК и мононуклеарных лейкоцитов в развитии воспалительного ответа. Как окислительный, так и нитрозильный стресс в большей мере развиваются в присутствии обоих типов клеток. Также следует отметить, что в отсутствие клеток ЭПК через 24 часа культивирования мононуклеарных лейкоцитов с лизатом вообще не наблюдается живых лейкоцитов, тогда как при сокультивировании лейкоцитов и клеток ЭПК в присутствии лизата они есть. Также наблюдается синергичный прирост концентрации TNF α в модели по сравнению с его синтезом клетками ЭПК и лейкоцитами при сокультивировании с бактериальным лизатом по отдельности. Для дальнейшего изучения возможных взаимодействий клеток ЭПК и мононуклеарных лейкоцитов их сокультивировали, разделяя мембраной с порами 0,4 мкм, запрещающими прямой контакт клеток, однако не препятствующими обмену сигнальными молекулами, в том числе, белками. Некоторые показатели воспалительного ответа значительно изменяются при таком сокультивировании (табл. 1).

Таким образом, весьма вероятно, что прямые взаимодействия клеток ЭПК и мононуклеарных лейкоцитов или, возможно, обмен коротко живущими сигнальными молекулами (как, например, NO или АФК), для которого также нужно близкое расположение этих клеток, играют важную роль в развитии

воспалительного ответа. Также возможно, что более быстрая гибель мононуклеарных лейкоцитов в отсутствие клеток ЭПК приводит к снижению выраженности воспаления. Важность подобных клеточных взаимодействий между клетками ЭПК и Т-лимфоцитами была показана в опытах по совместному культивированию этих клеток [11], в этой работе также использовались мембраны с порами 0,4 мкм и было отмечено снижение уровня синтеза некоторых цитокинов при сокультивировании клеток, разделенных этой мембраной.

Таблица 1. Сокультивирование клеток ЭПК (КП) и мононуклеарных лейкоцитов (ЛЦ) при разделении мембраной (данные представлены в виде среднее \pm ошибка среднего, n=4)

	Клетки ЭПК	Сокультивирование (ЭПК+ЛЦ+лизат)	Сокультивирование при разделении клеток мембраной
TNF- α в среде, пг/мл	0,2 \pm 0,1	16,6 \pm 2,9	5,3 \pm 2,2
DCF в клетках ЭПК, отн. ед.	1,4 \pm 0,1	7,4 \pm 0,4	5,1 \pm 0,3

В условиях окислительного стресса в митохондриях клеток активируются матриксные металлопротеиназы (ММП-2 и ММП-9). Ранее было показано, что ММП-9 активировалась в митохондриях кардиомиоцитов при гипергомоцистеинемии [14], при этом локализация этого белка в митохондриях была подтверждена иммуоцитохимически. Активность ММП-2 и ММП-9 в митохондриях клеток ЭПК была оценена с помощью зимографии и денситометрического анализа зимограммы (рис.11а). В предложенной модели не было показано изменения активности ММП-2 в модели, однако, наблюдалось ее небольшое увеличение при преинкубации клеток ЭПК с SkQR1 перед моделированием воспаления. Аналогичным образом повышалась активность ММП-9 (рис. 11а). Также наблюдалось увеличение активности ММП-9 при моделировании воспаления. С помощью вестерн-блоттинга для ММП-9 было показано, что возрастание активности ММП-9 коррелирует с возрастанием количества этого белка, а не активацией существующих незрелых форм (рис. 11б).

Так как ранее было показано защитное действие SkQR1 на клетки ЭПК в данной модели, следует предположить защитное действие активации ММП-9. Увеличение же активности в модели можно в таком случае объяснить компенсаторными защитными процессами, которые всегда возникают в клетках при стрессе. Дополнительным подтверждением отсутствия негативного эффекта от активации ММП-9 в митохондриях может служить отсутствие уменьшения количества антиапоптотического белка bcl-2 в митохондриях клеток ЭПК в модели воспалительного повреждения клеток ЭПК (рис.11б). Использование SkQR1 при моделировании воспаления приводит к еще

большему увеличению bcl-2. Таким образом, максимальное содержание ММП-9 в митохондриях сопровождается максимальным содержанием bcl-2.

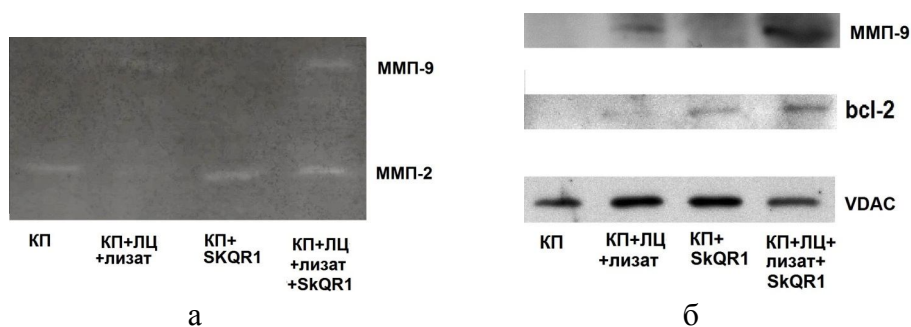


Рис. 11. Изменения, происходящие в митохондриях клеток ЭПК при моделировании воспаления и действии SkQR1. а – зимограмма, показывающая активность ММП-2 и ММП-9, б – иммуноблот, показывающий содержание ММП-9 и bcl-2 в образцах митохондриях клеток ЭПК.

Так как в предложенной модели гораздо более заметен эффект увеличения активности ММП-9 в митохондриях, то можно предположить, что активность именно этой протеазы важна для протекания процессов preconditionирования. На основании литературных данных была составлена следующая аминокислотная последовательность для поиска возможных субстратов ММП-9: P-R/K-S/T/G-L/I-S/T. Среди всех белков крысы, представленных в базе данных UniProt, имеющих митохондриальную локализацию и функцию, связанную с апоптозом, искали белки с такой последовательностью. Такое ограничение по функции было введено потому, что SkQR1 лучше остальных веществ защищает клетки ЭПК от гибели. Нашим требованиям отвечали два белка: апоптоз-индуцирующий фактор и протеинкиназа Ca (рис. 12), причем предполагаемый сайт разрезания находится на поверхности белка. Апоптоз-индуцирующий фактор при выходе из митохондрий может запускать апоптоз, а активность протеинкиназы Ca в митохондриях частично опосредует нефротоксическое действие цисплатина [15]. Препятствуя подобным процессам, ММП-9 может оказывать защитное действие на клетки ЭПК.

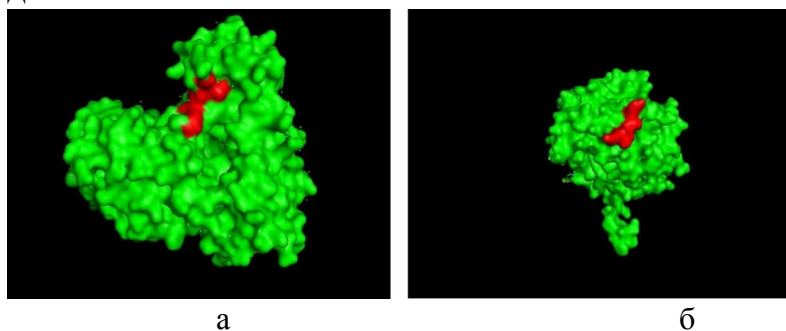


Рис. 12. Трехмерные структуры белков – возможных субстратов ММП-9 в митохондриях. а – апоптоз-индуцирующий фактор, б – протеинкиназа Ca. Показана поверхность белка, красным цветом отмечен предполагаемый сайт разрезания.

Выводы

1. При сокультивировании клеток первичной культуры эпителия почечных канальцев, мононуклеарных лейкоцитов и бактериального лизата наблюдаются такие характеристики воспаления, как развитие окислительного стресса, развитие нитрозильного стресса, гибель клеток.
2. Взаимодействие антигенов с клетками эпителия почечных канальцев и лейкоцитами частично опосредуется сигнализацией через Toll-подобные рецепторы 2 и 4. Активация этих рецепторов ведет к увеличению уровня окислительного стресса и уровня синтеза провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-6, IL-1 α), а ингибирование Toll-подобного рецептора 4 приводит к снижению выраженности этих процессов. Синтез IL-1 α в клетках эпителия почечных канальцев в условиях модельного воспаления ведет к накоплению его в ядрах, при этом увеличивается степень ацетилирования белков ядра.
3. Пространственное разделение клеток эпителия почечных канальцев и мононуклеарных лейкоцитов мембраной с порами 0,4 мкм в течение моделирования воспаления приводит к снижению уровня окислительного стресса в клетках эпителия почечных канальцев и концентрации TNF α в среде.
4. В митохондриях клеток эпителия почечных канальцев наблюдается повышение активности ММП-9 при сокультивировании их с мононуклеарными лейкоцитами и бактериальным лизатом.
5. Традиционный антиоксидант Trolox, митохондриально-адресованный антиоксидант SkQR1 и ионы лития защищают клетки эпителия почечных канальцев от окислительного стресса, нитрозильного стресса и гибели. SkQR1 и ионы лития лучше защищают клетки эпителия почечных канальцев от гибели, чем Trolox. SkQR1 также влияет на активность ММП-9 и содержание bcl-2 в митохондриях.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Чупыркина А.А., Даньшина М.И., Янкаускас С.С., **Моросанова М.А.**, Стельмашук Е.В., Васильева А.К., Горячева Е.С., Пирогов Ю.А., Исаев Н.К., Зоров Д.Б. Новое поколение Скулачев-ионов, обладающих выраженным нефро- и нейропротекторным действием // Биохимия. 2010. Т. 75, № 2. С. 177–184.
2. Янкаускас С.С., Плотников Е.Ю., **Моросанова М.А.**, Певзнер И.Б., Зорова Л.Д., Скулачев В.П., Зоров Д.Б. Митохондриально адресованный антиоксидант SkQR1 предотвращает вызванную гентамицином почечную недостаточность и потерю слуха // Биохимия. 2012. Т. 77, № 6. С. 818–823.
3. Зоров Д.Б., Плотников Е.Ю., Янкаускас С.С., Исаев Н.К., Силачев Д.Н., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Пулькиова Н.В., Зоров С.Д., **Моросанова М.А.** Фенопозная проблема: от чего гибнет организм? Уроки по почечной недостаточности // Биохимия. 2012. Т. 77, № 7. С. 893–906.
4. Plotnikov E.Y., Pulkova N.V., Pevzner I.B., Zorova L.D., Silachev D.N., **Morosanova M.A.**, Sukhikh G.T., Zorov D.B. Inflammatory pre-conditioning of mesenchymal multipotent stromal cells improves their immunomodulatory potency in acute pyelonephritis in rats // Cytotherapy. 2013. V.15, N. 6. P. 679-689.
5. Зоров Д.Б., Исаев Н.К., Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., **Моросанова М.А.**, Янкаускас С.С., Зоров С.Д., Бабенко В.А. Перспективы митохондриальной медицины // Биохимия. 2013. Т.78, № 9. С. 1251–1264.
6. **Моросанова М.А.**, Плотников Е.Ю., Певзнер И.Б., Зорова Л.Д., Зоров Д.Б. Гибель клеток почки при воспалении: роль окислительного стресса и митохондрий // Биологические мембраны. 2013. Т. 30, № 5-6. С. 445–453.
7. Plotnikov E.Y., **Morosanova M.A.**, Pevzner I.B., Zorova L.D., Manskikh V.N., Pulkova N.V., Galkina S.I., Skulachev V.P., Zorov D.B. Protective effect of mitochondria-targeted antioxidants in an acute bacterial infection // Proc Natl Acad Sci USA. 2013. V. 110, N. 33. P. E3100-E3108.
8. Зоров Д.Б., Плотников Е.Ю., **Моросанова М.А.**, Исаев Н.К., Певзнер И.Б., Хряпенкова Т.Г., Чупыркина А.А., Рогачева Н.В. Патент на изобретение №2425425 Модельная тест-система для проверки эффективности воздействия на воспалительный процесс в почечной ткани.
9. **Моросанова М.А.** Окислительный стресс в клеточной модели пиелонефрита in vitro // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2009», Москва, 13-18 апреля. Тезисы докладов, секция «Биоинженерия и биоинформатика». С. 21.
10. **Моросанова М.А.**, Зоров Д.Б., Плотников Е.Ю. Исследование механизмов повреждения клеток почки при пиелонефрите // Тезисы XXIII Международной зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, 7-10 февраля 2011. С.111.

11. **Моросанова М.А.**, Зоров Д.Б., Плотников Е.Ю. In vitro моделирование воспаления в почке // II Международная научно-практическая конференция "Достижения, инновационные направления, перспективы развития и проблемы современной медицинской науки, генетики и биотехнологий". Екатеринбург, 15 декабря 2011. С. 185-187.
12. **Morosanova M.A.**, Plotnikov E.Y., Pevzner I.B., Zorova L.D., Zorov D.B. Antioxidative kidney protection strategy in experimental pyelonephritis in vitro // 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress, 2012, Spain, Sevilla. FEBS Journal. V. 279, Suppl 1. P. 206.
13. Plotnikov E.Y., **Morosanova M.A.**, Pevzner I.B., Zorova L.D., Pulkova N.V., Zorov D.B. Antioxidative strategy to protect the kidney from experimental pyelonephritis in vitro and in vivo // 49th ERA-EDTA Congress, 2012, France, Paris, Nephrology Dialysis Transplantation, V. 27, Suppl. 2. P. 441-442.
14. Plotnikov E.Y., Zorov D.B., Chupyrkina A.A., Jankauskas S.S., **Morosanova M.A.**, Pevzner I.B., Pulkova N.V., Zorova L.D. Protection of mitochondria: new target to prevent nephrotoxicity // 49th ERA-EDTA Congress, 2012, France, Paris, Nephrology Dialysis Transplantation, V. 27, Suppl. 2. P. 338.
15. Jankauskas S.S., Pevzner I.B., Zorova L.D., Babenko V.A., **Morosanova M.A.**, Plotnikov E.Y., Zorov D.B. Mitochondria-targeted approaches to prevent gentamycin toxicity // 50th ERA-EDTA CONGRESS, MAY 18–21, 2013, Istanbul, Turkey, Nephrology Dialysis Transplantation, V. 28, Suppl. 1. P.100.
16. Zorov D.B., Jankauskas S.S., Zorov S.D., Plotnikov E.Y., Pevzner I.B., **Morosanova M.A.**, Silachev D.N., Zorova L.D. Mitochondria as a target to treat kidney pathologies and prevent organism death // 50th ERA-EDTA CONGRESS, MAY 18–21, 2013, Istanbul, Turkey, Nephrology Dialysis Transplantation, V. 28, Suppl. 1. P. 105-106.
17. Pevzner I.B., Pulkova N.V., **Morosanova M.A.**, Plotnikov E.Y., Sukhikh G.T., Zorova L.D, Zorov D.B., Silachev D.N. Inflammatory preconditioning of multipotent stromal cells improves their immunomodulatory potency under acute pyelonephritis in rats // 50th ERA-EDTA Congress, may 18–21, 2013, Istanbul, Turkey, Nephrology Dialysis Transplantation, V. 28, Suppl. 1. P. 108.
18. Плотников Е.Ю., **Моросанова М.А.**, Певзнер И.Б., Зорова Л.Д., Зоров Д.Б. Гибель клеток почки при воспалении: роль окислительного стресса и митохондрий // Международная конференция "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация", Пушкино. 27-30 мая 2013. С. 593-597.

Список цитируемой литературы:

1. Mundi H., Björkstén B., Svanborg C., Ohman L., Dahlgren C. (1991) Extracellular release of reactive oxygen species from human neutrophils upon interaction with *Escherichia coli* strains causing renal scarring. *Infect Immun* 59(11), 4168-72.
2. Bonventre J.V., Zuk A. (2004) Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 66(2), 480-5.
3. Gripar S.C., Richardson W.M., Sodhi C.P., Hackam D.J. (2008) No longer an innocent bystander: epithelial toll-like receptor signaling in the development of mucosal inflammation. *Mol Med* 14(9-10), 645-59.
4. Hato T., El-Achkar T.M., Dagher P.C. (2013) Sisters in arms: myeloid and tubular epithelial cells shape renal innate immunity. *Am J Physiol Renal Physiol* 304(10), F1243-51.
5. Goligorsky M.S., Brodsky S.V., Noiri E. (2002) Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kidney International* 61(3), 855-861.
6. Bens M., Vandewalle A. (2008) Cell models for studying renal physiology. *Pflugers Arch* 457(1), 1-15.
7. Sohn E.J., Paape M.J., Connor E.E., Bannerman D.D., Fetterer R.H., Peters R.R. (2007) Bacterial lipopolysaccharide stimulates bovine neutrophil production of TNF-alpha, IL-1beta, IL-12 and IFN-gamma. *Vet Res* 38(6), 809-18.
8. Reilly S.J., Odeberg J., Tornvall P. (2011) Use of the whole leucocyte population in the study of the NFκB pathway. *Scand J Immunol* 73(4), 338-43.
9. Deckers J.G., Van Der Woude F.J., Van Der Kooij S.W., Daha M.R. (1998) Synergistic effect of IL-1alpha, IFN-gamma, and TNF-alpha on RANTES production by human renal tubular epithelial cells in vitro.
10. Tsuboi N., Yoshikai Y., Matsuo S., Kikuchi T., Iwami K., Nagai Y., Takeuchi O., Akira S., Matsuguchi T. (2002) Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol* 169(4), 2026-33.
11. Kuroiwa T., Schlimgen R., Illei G.G., McInnes I.B., Boumpas D.T. (2000) Distinct T cell/renal tubular epithelial cell interactions define differential chemokine production: implications for tubulointerstitial injury in chronic glomerulonephritides. *J Immunol* 164(6), 3323-9.
12. Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. (2006) Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta* 1757(5-6), 509-17.
13. Buryškova M., Pospisek M., Grothey A., Simmet T., Burysek L. (2004) Intracellular interleukin-1alpha functionally interacts with histone acetyltransferase complexes. *J Biol Chem* 279(6), 4017-26.
14. Moshal K.S., Tipparaju S.M., Vacek T.P., Kumar M., Singh M., Frank I.E., Patibandla P.K., Tyagi N., Rai J., Metreveli N., Rodriguez W.E., Tseng M.T., Tyagi S.C. (2008) Mitochondrial matrix metalloproteinase activation decreases myocyte contractility in hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(2), H890-7.
15. Nowak G. (2002) Protein kinase C-alpha and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na⁺ transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells. *J Biol Chem* 277(45), 43377-88.