

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

на правах рукописи



Брезгунова Анна Александровна

**Изучение механизмов острого почечного повреждения
и подходов к нефропротекции при ишемии почки и
системном воспалении**

Специальность — 1.5.5. — Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в лаборатории структуры и функций митохондрий Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Научные
руководители:**

Плотников Егор Юрьевич, доктор биологических наук, профессор РАН
Певзнер Ирина Борисовна, кандидат биологических наук

**Официальные
оппоненты:**

Ельчанинов Андрей Владимирович, доктор медицинских наук, доцент, «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», лаборатория роста и развития, заведующий лабораторией.

Горбачева Любовь Руфэлевна, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, лаборатория общей физиологии и регуляторных пептидов, ведущий научный сотрудник.

Бережнов Алексей Валерьевич, доктор биологических наук, Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН». лаборатория клеточных механизмов нейропатологий, ведущий научный сотрудник.

Защита диссертации состоится «9» декабря 2024 года в 15:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.7 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, ауд. М-1.

E-mail: belka.umarova.msu@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте Диссовет 2.0: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3180>

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.015.7,
доктор биологических наук

Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы

Острое почечное повреждение (ОПП) является патологическим состоянием с быстрым и резким снижением почечной функции и ассоциировано с повышенным риском развития хронической болезни почек (ХБП) [Makris, Spanou, 2016; Negi и др., 2018]. ОПП является частым осложнением и выявляется в 15% случаев госпитализаций в целом, а также более чем у 50% больных в палатах интенсивной терапии [Khan, Khan, 2015]. В настоящее время не существует специальной фармакологической терапии для пациентов с ОПП, а стратегия лечения ограничивается поддерживающей и заместительной почечной терапией, которая ассоциирована с повышением уровня смертности до 50% [Mercado, Smith, Guard, 2019]. Кроме того, ОПП является частым осложнением у новорожденных пациентов с системным воспалением, лечение которого сопряжено с использованием терапии антибиотиками, в свою очередь обладающими нефротоксичностью [Coggins и др., 2021; Mohamed и др., 2022]. В связи с высокой распространенностью и отсутствием специфической терапии ОПП, требуется более детальное изучение молекулярных механизмов повреждения и регенерации почек, что позволит разработать целенаправленные методы лечения ОПП и ХБП.

В настоящее время для изучения механизмов ОПП используют различные экспериментальные подходы, например, модель ишемии/реперфузии (И/Р) почки и модели повреждения, индуцированного эндотоксином или нефротоксичными веществами [Wao и др., 2018; Shiva и др., 2020]. Основной особенностью этих широко используемых подходов является развитие генерализованного поражения органа. В настоящее время существует очень мало моделей ОПП, направленных на образование локального очага повреждения, при котором можно четко визуализировать границу между поврежденной и здоровой тканью. Такой подход позволяет наблюдать процессы в зоне, в которой произошло сублетальное повреждение с возможностью восстановления, что открывает новые возможности изучения изменений непосредственно в очаге инфаркта и прилегающих участках. Это объясняет необходимость разработки новых моделей повреждения почки, приводящих к развитию локального повреждения органа. Такие подходы хорошо описаны для мозга, например, при моделировании инсульта широко применяются фототромбоз с использованием фотосенсибилизатора Бенгальского розового [Watson и др., 1985]. Модель фототромбоза проста в реализации, обладает высокой воспроизводимостью и малой инвазивностью, что объясняет ее активное использование для изучения патологий головного мозга [Uzdensky, 2018]. Однако, несмотря на распространенность при моделировании инсульта, эта модель еще не адаптирована для других органов. Учитывая широту применения фототромбоза при инфаркте головного мозга, а также простоту реализации данной модели, мы предполагаем, что этот метод может быть использован для моделирования ишемических патологий различных органов, в том числе почек. Мы предполагаем, что ишемия почек, вызванная фототромбозом, может стать полезной моделью для лучшего понимания молекулярных механизмов повреждения почек как при ОПП, так и при ХБП, а также регенерации поврежденного органа.

В связи с тем, что заболевания, ассоциированные с ишемическим повреждением ткани или системным воспалением, являются одними из ведущих причин инвалидизации и смертности, активно ведутся научные исследования, посвященные развитию данных состояний. Несмотря на большое внимание к данной проблеме до сих пор имеются пробелы в понимании фундаментальных механизмов развития подобных повреждений, что осложняет поиск их терапии. Одним из механизмов, лежащих как в основе запуска повреждения, так и адаптации ткани к ишемии, является процесс воспаления. Хотя в целом оно является нормальным ответом ткани и участвует в ее восстановлении, во многих случаях данная реакция организма проявляется чрезмерно и может приводить к еще большему повреждению тканей [Rabb и др., 2016]. Поэтому важно выявить, в какой момент и при каких условиях данная реакция переходит из адаптивной в патологическую. В ответ на ишемию и гипоксию повышается экспрессия молекул адгезии клетками сосудистой стенки и происходит активация лейкоцитов [Bonventre, Yang, 2011]. Данные события повышают секрецию провоспалительных и профибротических молекул, приводят к активации свертывания крови и ухудшению кровотока в капиллярах. Повышается адгезия и инфильтрация иммунных клеток, таких как нейтрофилы и макрофаги, секретирующие фактор некроза опухоли- α (TNF- α) и провоспалительные интерлейкины, повышение экспрессии которых связано со значительным тканевым повреждением при ОПП [Bonventre, Zuk, 2004]. Кроме того, активация эндотелия и привлечение циркулирующих иммунных клеток происходит при высвобождении некротизированными клетками молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением [Anders, Schaefer, 2014]. Одними из ключевых участников этих процессов являются нейтрофилы, которые могут приводить к дальнейшему повреждению эпителиальных клеток почечных канальцев [Kinsey, Li, Okusa, 2008]. Продукция цитокинов, протеаз, металлопротеаз, активных форм кислорода данными иммунными клетками приводит к повышенной сосудистой проницаемости, а также нарушению целостности эпителиальных и эндотелиальных клеток канальцев, что усугубляет повреждение почек [Parkos, 2016]. В связи с тем, что воспаление играет важную роль в большинстве патологий, новые подходы к терапии ОПП могут быть основаны на регуляции воспалительной реакции. Помимо традиционных противовоспалительных препаратов, одним из многообещающих соединений является производное омега-3 жирной кислоты, схожее по структуре с анандамидом - этаноламид докозагексаеновой кислоты, синаптамид. Данное вещество ранее изучалось в контексте повреждения мозга и обладало выраженными нейропротекторными и синаптогенными эффектами, а также снижало нейровоспаление [Kim и др., 2011; Kim, Spector, 2013; Ponomarenko и др., 2021; Starinets, Tyrtysnaia, Manzhulo, 2023].

Таким образом, изучение молекулярных и клеточных механизмов повреждения почки после ишемии или системного воспаления является актуальной исследовательской задачей. Разработка новой экспериментальной модели ОПП поможет более детально изучить морфофункциональные особенности повреждения и восстановления органа и в дальнейшем может быть использована для тестирования терапевтических веществ. Изучение таких последствий повреждения, например, воспаления может помочь в выявлении потенциальных мишеней для модуляции этих негативных последствий, а поиск нефропротекторных веществ не только приближает разработку эффективной патогенетической терапии, но и может быть полезен для выявления ключевых патогенетических звеньев ОПП.

Целью данной работы являлось изучение механизмов острого почечного повреждения в моделях ишемии и системного воспаления, а также поиск потенциальных подходов для терапии ОПП.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи данной работы**:

- 1) Разработка новой экспериментальной модели фокальной ишемии почки, основанной на фотоиндуцированном тромбозе сосудов, и подбор оптимального методического протокола
- 2) Всесторонняя характеристика модели фототромбоза почки с точки зрения гибели клеток почки, их регенерации, изменений в ткани почки и развития воспаления, а также оценки тяжести развивающегося ОПП
- 3) Оценка влияния терапии синаптамидом на фоне ОПП, вызванного ишемией/реперфузией почки, на воспалительный статус поврежденного органа, изменение степени инфильтрации и популяционного состава иммунных клеток в почке
- 4) Выявление механизмов противовоспалительного действия синаптамида на фоне И/Р и исследование роли нейтрофилов в патогенезе ОПП
- 5) Оценка развития почечного повреждения у новорожденных при действии липополисахарида (ЛПС), при последовательном введении ЛПС и гентамицина, а также исследование влияния применения антибиотиков у новорожденных пациентов с подозрением на сепсис с точки зрения тяжести ОПП.

Научная новизна работы

В рамках данной работы впервые разработана новая экспериментальная модель повреждения почки, основанная на фотоиндуцированном тромбозе сосудов, вызванном световой активацией молекул фотосенсибилизатора Бенгальского розового. Данная модель широко применялась для моделирования инсульта, однако слабо транслировалась на другие органы. Разработан методический протокол, который можно будет адаптировать в зависимости от целей исследования. Кроме того, развивающееся повреждение охарактеризовано морфологически, гистологически и функционально, чего не было продемонстрировано ранее ни в одном исследовании.

Впервые оценено влияние синаптамида на И/Р-индуцированное острое почечное повреждение, а также выявлен предположительный механизм действия данного вещества. Применение синаптамида снижало И/Р индуцированное воспаление, что выражалось в снижении TNF- α , IL-6 и IL-1 β . Впервые показано противовоспалительное действие синаптамида, которое реализуется через рецептор GPR110 нейтрофилов.

Впервые показано, что однократное введение антибиотика гентамицина может снижать тяжесть ОПП, вызванного системным воспалением у новорожденных животных. Проведен сбор и анализ клинических данных пациентов и предложены антибиотики, которые не усугубляют развитие ОПП у новорожденных пациентов с сепсисом.

Теоретическая и практическая значимость

Фундаментальная научная проблема, на решение которой направлена работа - исследование механизмов повреждения одного из жизненно важных органов, почки, с целью поиска возможных подходов к увеличению устойчивости данного органа к повреждению. Понимание факторов, влияющих на развитие повреждения и ишемическую толерантность конкретного органа, является основой стратегией поиска терапии не только ОПП, но и других патологических

состояний, ассоциированных с ишемией, таких как инсульт и инфаркты органов, а также патологий, при которых возможно недостаточное снабжение тканей кислородом и питательными веществами.

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, представляются значимыми с точки зрения, как фундаментальной науки, так и клинической медицины, так как в ней раскрываются молекулярные механизмы, объясняющие причины развития почечного повреждения, а также тестируются возможные терапевтические агенты. Помимо этого, с точки зрения экспериментальных исследований значимость заключается в разработке новой экспериментальной модели очаговой ишемии почки, которая в дальнейшем может быть использована другими исследователями. Но не менее важна и клиническая значимость, так как полученные данные могут лечь в основу разработки перспективных методов терапии ОПП. Кроме того, показаны антибиотики, которые не усугубляли тяжесть ОПП у пациентов с сепсисом, что может быть полезно в клинической практике и корректировке курса антибактериальной терапии.

Методология и методы исследования

В работе проводилось моделирование эндотоксинемического ОПП на новорожденных крысах или И/Р-индуцированного ОПП на взрослых крысах. Кроме того, в рамках диссертации была разработана новая экспериментальная модель, вызванная фотоиндуцированным тромбозом сосудов, которая до этого никогда не использовалась для моделирования повреждения почки. Для оценки функции и повреждения почек после моделирования ОПП у животных оценивали такие маркеры, как креатинин и мочевины в сыворотке крови, а также липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов (NGAL) и молекула повреждения почек 1 (KIM-1) в моче.

В случае новой экспериментальной модели фототромбоза почки оценивали объем повреждения путем окрашивания целой почки хлоридом 2,3,5-трифенилтетразолия (ТТС) или с помощью метода микрокомпьютерной томографии. Проницаемость сосудов оценивали по экстравазации красителя Эванса синего из кровотока в ткань почки. Через 24, 48 часов или через 1 месяц почки с локальным очагом повреждения фиксировались в формалине для изготовления срезов и гистологических окрашиваний, таких как гематоксилин-эозин, реакция с Шифф-йодной кислотой (ШИК-реакция), окраски для оценки состояния внеклеточного матрикса и развития фиброза. Кроме того, проводили иммуногистофлуоресцентные окрашивания антителами против β -актина, KIM-1, ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA).

У экспериментальных животных после моделирования различных типов повреждения получали образцы гомогенатов почечной ткани, в которых с помощью метода вестерн-блоттинга исследовали воспаление, интенсивность окислительного стресса, активацию апоптоза или активность процессов регенерации.

Для исследования влияния синаптамида на воспаление, развивающееся при И/Р почки, получали суспензии клеток почки для анализа методами проточной цитофлуориметрии и флуоресцентно-активируемого сортирования. Отобранные таким образом клетки использовали для дальнейшего исследования методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени. Также получали образцы крови и почек для исследования различных маркеров, ассоциированных с воспалением, методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Фотоиндуцированный тромбоз сосудов с использованием фотосенсибилизатора Бенгальского розового подходит для моделирования ОПП и приводит к развитию выраженного очага повреждения, при котором наблюдается нарушение нормальной морфологии ткани почки, индукция апоптоза в зоне очага, активация пролиферативных процессов вокруг поврежденной зоны, а через месяц после фототромбоза в области инфаркта наблюдается развитие воспаления и фиброза.
2. При ишемии/реперфузии почки развивается воспаление в ткани, которое выражается в увеличении экспрессии провоспалительных цитокинов, а также в увеличении инфильтрации лейкоцитов, представленных нейтрофилами и макрофагами.
3. Терапия синаптамидом приводит к выраженному противовоспалительному эффекту на фоне И/Р-индуцированного ОПП, который реализуется через рецептор GPR110, расположенный на нейтрофилах, однако не снижает уровень маркеров ОПП при использованной дозе и длительности лечения.
4. Сепсис или системный воспалительный ответ вызывают развитие неонатального ОПП как в моделях на животных, так и у пациентов в клинике.
5. Применение гентамицина на фоне ЛПС-индуцированного ОПП у новорожденных крыс приводит к снижению тяжести повреждения почек, а ампициллин в комбинации с сульбактамом или метронидазол улучшает функцию почек у пациентов с признаками сепсиса.

Степень достоверности данных

Полученные в рамках выполнения работы данные статистически достоверны и воспроизводимы. Для решения поставленных задач выбран оптимальный набор современных экспериментальных методик. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальной литературы.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, из которых 8 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных.

Апробация работы и публикации

Результаты диссертационной работы были представлены на международных конференциях: XVII Международной (XXVI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции (Москва, 2022), XXVIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные Проблемы Биомедицины - 2022» (Санкт-Петербург, 2022), 12-я международная конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация" (Пушино, 2023), V Научно-практической конференции «Экспериментальная Хирургия, Анестезиология И Реаниматология Лабораторных Животных» (Москва, 2023), Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии. Регенеративная биология и медицина» (2023, Москва, 15-16 ноября 2023), XIX Международной (XXVIII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, (Москва, март 2024), Всероссийской

конференции с международным участием "Биохимия человека 2024" (17-19 октября 2024). По материалам работы опубликованы 8 тезисов докладов в сборниках российских и международных конференций.

Диссертационная работа апробирована на заседании отдела функциональной биохимии биополимеров НИИ ФХБ им. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова и на заседании кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Личный вклад автора

Соискатель лично принимала участие во всех этапах выполнения диссертационной работы, а именно планировала и проводила эксперименты, осуществляла моделирование патологий на животных методами экспериментальной хирургии, проводила биохимические, молекулярно-биологические и иммуногистофлуоресцентные исследования, подготовку клинических данных пациентов для биоинформатического анализа, статистическую обработку и обобщение результатов, написание статей и тезисов и представляла результаты работы на российских и международных конференциях.

Структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, методов и материалов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 156 страницах и иллюстрирована 36 рисунками. Список цитируемой литературы включает 216 наименований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание, уход за животными. Эксперименты проводились на беспородных крысах, содержащихся в виварии с 12-часовым световым циклом при постоянной температуре ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Крысы имели неограниченный доступ к воде и пище, стандартному корму для грызунов. В зависимости от задачи использовались или самцы крыс возрастом 3-4 месяца и массой 300-400 граммов или неонатальные крысы возрастом 3-7 дней. Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с Правилами лабораторной практики, определенными Приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. N 708н г. Москва. На проведение экспериментального исследования было получено разрешение Комиссии по биоэтике НИИ Физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского (протокол №3/19 от 18 марта 2019 г.).

Фототромбоз (ФТ) почки. Перед операцией крысы наркотизировались путем внутрибрюшинного введения хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. Далее в яремную вену вводился краситель Бенгальский розовый в дозе 40 мг/кг. Затем крысы помещались на нагретый до 37 градусов коврик для поддержания постоянной температуры тела на протяжении всей операции ($37 \pm 0.5^\circ\text{C}$). Далее проводили вскрытие брюшной полости, освобождали левую почку и располагали лазер (520 nm) на расстоянии 2 мм над нижней частью почки. Через 5 минут после инъекции Бенгальского розового включали лазер на 10 минут. После выключения источника света зашивали брюшную полость. Почки отбирали через 24 ч, 48 ч или 1 месяц после моделирования ишемии почек, вызванной фототромбозом, для различных экспериментальных подходов. Чтобы вызвать увеличение очага фототромбоза, мы следовали аналогичному протоколу, но использовали

источник света с большим диаметром луча (6 мм) и проводили контралатеральную нефрэктомию.

Ишемия/реперфузия почки и терапия синаптамидом. Крыс наркотизировали и размещали на подогреваемом коврике для поддержания постоянной температуры тела животных во время операции. Осуществляли доступ к почке через переднюю брюшную стенку, освобождали сосудистый пучок, идущий к левой почке, от жировой ткани и накладывали микрососудистый зажим на 40 минут. Через 24 часа после И/Р у крыс собирали мочу для оценки маркеров ОПП NGAL или KIM-1. Кроме того, через 48 часов после И/Р проводили забор крови из сонной артерии для оценки уровней креатинина и мочевины в сыворотке. Также через 48 часов после И/Р забирали образцы почек для последующего вестерн блоттинга. Часть животных за 5 дней до И/Р начинала получать терапию синаптамидом, выделенным из печени дальневосточного кальмара, путем подкожного введения в течение 7 дней.

ЛПС-индуцированное ОПП. Эндотоксинемическое ОПП моделировали путем внутрибрюшинного введения очищенного липополисахарида (ЛПС) *E. coli* штамма 0127:B8 (Sigma, США), контрольной группе вводили физиологический раствор. Разным группам вводили ЛПС в дозе 4 мг/кг, 2 мг/кг, а также проводили терапию антибиотиком гентамицином в дозе 50 мг/кг через 24 часа после ЛПС или 150 мг/кг через 1 час после ЛПС. Через 24 часа или 48 часов после введения ЛПС забирали мочу, кровь, почки для анализа на маркеры ОПП, клеточной пролиферации и активации апоптоза.

Клинические данные пациентов. В течение 3 лет у 44 новорожденных пациентов отделения неонатальной хирургии Национального медицинского исследовательского Центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова были собраны образцы мочи и крови для анализа. Было получено информированное согласие родителей всех пациентов на исследование, которое было одобрено научно-исследовательским советом Центра в соответствии с Законом Российской Федерации "О здравоохранении". Клинический анализ мочи, биохимические анализы крови и другие анализы проводились неонатологами каждые 1-2 дня для оценки состояния здоровья пациентов и коррекции лечения антибиотиками. Образцы мочи для вестерн-блоттинга и ИФА собирались в динамике каждые 3-5 дней на протяжении всего периода госпитализации пациентов. У всех пациентов ежедневно контролировалась температура тела. Оценку функции почки проводили по уровню мочевины в сыворотке крови.

Диагностика ОПП. Для оценки тяжести развивающегося ОПП в данной работе оценивали концентрации креатинина и мочевины в сыворотке крови с помощью анализатора AU480 (Beckman Coulter, США). Также оценивали уровни маркеров почечного повреждения NGAL и KIM-1 в моче методом вестерн-блоттинга через 6, 24 или 48 часов после моделирования ОПП.

Микро-КТ. Для проведения микро-КТ крысам транскардиально вводили 100 мл PBS, а затем 100 мл 4 %-ного забуференного раствора свежеприготовленного параформальдегида, извлекали левую почку и фиксировали в течение 24 ч. После этого образцы обезжировали в градуированном этаноле и окрашивали 1% йодом в течение 30 часов для контрастирования всей почки. Для анализа был использован лабораторный микрокомпьютерный томограф Bruker Skyscan 1276 (Bruker, Бельгия). Образцы сканировали с воксельным разрешением 8-10 мкм при напряжении 90 кВ, мощности источника 200 мкА и применяли алюминий-медный фильтр (AlCu). Реконструкцию отсканированных образцов проводили в программном обеспечении NRecon (Bruker, Бельгия) с одинаковыми

параметрами. Полученные микро-КТ-изображения были проанализированы в программном обеспечении ORS Dragonfly 2021.3 (ORS inc, Канада).

Тест на жизнеспособность клеток. Очаг повреждения визуализировали путем окрашивания целой почки 1%-ным хлористым 2,3,5-трифенил-2Н-тетразолий хлоридом (ТТС), разведенным на среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), в течение 20 минут при комнатной температуре. Оценку проводили в контроле, а также через 24 и 48 ч после индукции фототромбоза почки.

Оценка проницаемости сосудов. Проницаемость сосудов оценивали по проникновению красителя Эванса синего из кровотока в ткань почки. Для этого крысам через 24 или 48 ч после фототромбоза вводили Эванс синий (0,5%), через 30 минут после инъекции проводили транскардиальную перфузию животного фосфатно-солевым буфером для вымывания красителя, извлекали почку и проводили визуальную оценку появления Эванса синего в зоне очага повреждения.

Гистология. Почки, фиксированные в параформальдегиде, были заключены в парафин и нарезаны на микротоме на срезы толщиной 4 мкм. Для оценки морфологии почки срезы инкубировали в гематоксилине в течение 5 минут, промывали в проточной воде (5 минут) и окрашивали в 1% растворе эозина В в течение 10 минут. Окрашивание на фибрин включало обработку гематоксилином по Вейгерту, инкубацию в 0.5% растворе Мартиуса желтого, окрашивание в 1% растворе бриллиантового кристаллического красного, окрашивание в 0.5% растворе метиленового синего. Для проведения ШИК-реакции срезы окисляли 0.5% перйодной кислотой в течение 5 минут, промывали дистиллированной водой, окрашивали реактивом Шиффа в течение 15 минут, ядра окрашивали гематоксилином. Окрашивание на ретикулин проводили по методу Гордона-Свита. Для оценки фиброза проводили окрашивание по Массону или пикрополихромное окрашивание. Для окрашивания по Коссу срезы инкубировали в 3% растворе нитрата серебра при ярком свете, промывали в дистиллированной воде в течение 5 минут, фиксировали в 5% растворе тиосульфата натрия и после промывки окрашивали ядерным красным. Все окрашенные срезы дегидратировали в спиртах, очищали в ксилоле и заключали под покровное стекло. Окрашенные срезы почек оценивали с помощью микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия) с камерой MRc.5 (Carl Zeiss, Германия), проводили съемку срезов почек и описывали морфологические изменения, происходящие в очаге повреждения и окружающих тканях.

Иммуногистофлуоресцентное окрашивание (ИГФ). Срезы депарафинизировали и гидратировали через градуированные ксилолы и этанол. Для восстановления антигенов срезы помещали в стакан с буфером Tris-EDTA (20 mM Tris Base, 1 mM EDTA, 0.1% Tween 20, pH 8.0) и инкубировали при 95 °C в течение 20 минут. Пермеабиллизацию и блокировку проводили с использованием 0.1% Triton X-100 и 1% бычьего сывороточного альбумина в PBS при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем срезы инкубировали в течение ночи при 4 °C с первичными антителами против β -актина (A2228, Sigma, США), молекулы повреждения почек (KIM-1) (MAA785Ra21, Cloud Clone Corp., КНР) или антигена пролиферирующих клеток (PCNA) (13110, Cell Signaling, США). Затем инкубировали в течение 1 часа с вторичными антителами, конъюгированными с FITC или AlexaFluor 568. После окрашивания добавляли среду заключения Fluoroshield (Sigma, США), накрывали покровным стеклом и исследовали на инвертированном конфокальном микроскопе LSM900 (Carl Zeiss, Германия). Количественный анализ конфокальных изображений проводился с использованием программы с открытым исходным кодом Fiji/ImageJ (версия

2.9.0). Количественная оценка в случае маркера KIM-1 заключалась в измерении средней интенсивности флуоресценции каждого поля зрения среза. Также мы подсчитывали количество PCNA-положительных клеток, нормированное на общее количество ядер, оцененное с помощью окрашивания DAPI, для каждого поля зрения.

Забор образцов для электрофореза и вестерн-блоттинга. У новорожденных и взрослых крыс собирали образцы мочи и добавляли 1mM ингибитора протеаз PMSF, вортиксировали и добавляли равный объем 2-кратного буфера для образцов (SB), кипятили пробы в твердотельном термостате при 99°C, после чего замораживали. Кровь отбирали и оставляли на 15 минут на комнатной температуре для формирования сгустка, после чего центрифугировали при 5000 rpm в течение 10 минут, отбирали сыворотку для анализа и замораживали. Гомогенизацию почек проводили с помощью ручного гомогенизатора в PBS с добавлением 1 mM PMSF, после чего центрифугировали гомогенат 3000 rpm 3 минуты при +4°C для удаления крупных фрагментов ткани. Образовавшийся после центрифугирования супернатант отбирали для измерения концентрации белка с помощью набора с бичинхониновой кислотой (SigmaAldrich, USA) и для приготовления образцов для электрофореза по Лэммли, для чего отбирали 300 мкл супернатанта, добавляли к ним 4-кратный SB и нагревали 5 минут при 99°C, после чего замораживали.

Подготовка проб к проведению электрофореза. Образцы мочи, смешанные с 2-кратным SB, кипятили 5 минут при 99°C, после чего центрифугировали 12000 rpm 3 минуты для удаления нерастворимых агрегатов белка. Для проведения электрофореза в полиакриламидный гель наносили по 20 мкл каждого образца. Сыворотку для анализа методом вестерн-блоттинга разводили в PBS в 70 раз, добавляли 4-кратный буфер для образцов и кипятили 5 минут при 99°C. После кипячения центрифугировали образцы 12000 rpm 3 минуты, на гель наносили по 5 мкл каждого образца. Гомогенаты почек, уже смешанные с 4-кратным буфером для образцов, разводили 1-кратным буфером до одинаковой концентрации общего белка, равной 2 мг/мл. На фореz наносили по 5 мкл каждого образца, то есть по 10 мкг общего белка.

Вестерн-блоттинг. После разделения белков на электрофорезе, их переносили методом полусухого электропереноса на мембрану PVDF при силе тока 1A в течение 30 мин (стандартная программа для прибора Trans Blot Turbo, BioRad, США). После этого мембраны блокировали в течение 1 ч при 25°C в PBS, содержащем 5% обезжиренного сухого молока и 0,05% Tween-20. Мембраны инкубировали с соответствующими первичными антителами, разведенными на PBS/0,1% BSA/Tween-20 в течение ночи при +4°C. В моче детектировали появление при ОПП белков NGAL и KIM-1 с помощью специфических антител (NGAL - ab63929, Abcam, США, KIM-1 - MAA785Ra21, Cloud-Clone Corp., USA). В сыворотке анализировали уровень маркера цистатин С (ab109508, Abcam, США). В гомогенатах почки оценивали пролиферативную активность клеток по уровню белка PCNA (sc-7907, Santa Cruz, США), и активацию апоптоза по содержанию расщепленной (активированной) каспазы-3 (9661, Cell signaling technology, США), TNF- α (ab66579, Abcam, США) и IL-6 (SAB5700632, Sigma, США). Далее проводили инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (P-GAR Iss или P-GAM Iss, IMTEK, Россия), в разведении 1:5000 в PBS/Tween-20. Полосы детектировали с помощью хемилюминесцентного субстрата Advansta Western Bright ECL (Advansta, USA). Хемилюминесценция детектировалась прибором ChemiDoc MP ImagingSystem

(Bio-Rad, США), после чего изображения анализировали с помощью программы ImageLab или ImageJ.

Проточная цитофлуориметрия и сортировка клеток. Суспензия клеток из почек интактных крыс, а также через 48 часов после И/Р или И/Р и введения синаптамида была приготовлена с помощью MediMachine (BD, США), после чего была пропущена через 40-микрометровый фильтр. Для окрашивания клеточной поверхности использовались моноклональные антитела анти-CD11b/c-PE (Miltenyi Biotec, Германия). Для этого клетки инкубировали с антителами при температуре +4°C в течение 20 минут, промывали в фосфатно-солевом буфере (PBS) и анализировали на клеточном сортере FACS Aria SORP (BD Biosciences, США). Для анализа данных использовалось программное обеспечение Diva (BD Biosciences, США). CD11b/c-положительные клетки сортировали с использованием клеточного сортера FACS Aria SORP (BD Biosciences, США) с использованием сопла диаметром 70 мкм и соответствующих параметров давления.

ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для количественной ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией были собраны образцы почек и крови, а также фракция CD11b/c⁺ клеток, полученная с помощью сортировки.

Ткань почки гомогенизировали в соответствующем объеме реагента Trizol (Thermo Fisher Scientific Inc., Invitrogen, США) с использованием гомогенизатора Поттера. После выделения водной фазы, содержащей нуклеиновые кислоты, с использованием хлороформа и обработки 75% этанолом, последующие этапы выделения общей РНК и обработки ДНКазой проводились с использованием набора RNeasy plus mini kit (QIAGEN GmbH, Германия) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. После экстракции РНК концентрация и чистота были определены с помощью NanoPhotometer (Implen, Германия) путем измерения концентрации РНК и чистоты по соотношениям A260/A280 и A260/A230.

ПЦР в реальном времени проводили с использованием циклера CFX96 Touch (Bio-Rad, США) и SYBR Green I (Bio-Rad, США). Все образцы были проанализированы в трипликатах. Праймеры, (DNA-synthesis, Россия), использованные в данной работе (Таблица 1), были разработаны с использованием программы Beacon Designer 7 (Premier Biosoft Int., США). Специфичность праймеров была оценена с помощью анализа кривой плавления. Эффективность праймеров была рассчитана путем построения стандартной кривой для каждого целевого гена с использованием пятикратного серийного разведения кДНК и находилась в диапазоне 1.8–2.0. Уровни экспрессии мРНК рассчитывались как $E^{-\Delta Ct}$, где E — это эффективность праймера, а Ct — это номер цикла, на котором флуоресценция продукта превышала пороговый уровень. Эти значения нормализовали к пороговым циклам гипоксантинфосфорибозилтрансферазы 1 (HPRT), полиубиквитина-С (UBC) или Рибосомальный белок большой субъединицы, P0 (RPLP0).

Образцы крови были собраны у анестезированной крысы через яремную вену с использованием шприца с раствором гепарина (1000 МЕ). Полученный образец крови был затем наложен на раствор фикола и центрифугирован при 600 g в течение 30 минут. После центрифугирования сыворотка отбиралась с помощью аспиратора, а кольцо, содержащее мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), было аккуратно собрано с помощью пипетки и затем перенесено в 10-кратный объем буфера RLT. Экстракция РНК выполнялась в соответствии со стандартным протоколом RNeasy для тканей животных.

Статистический анализ результатов. Обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 9. Данные выборки были проверены на нормальное распределение с помощью теста Шапиро-Уилка. Для выявления отличий между группами в зависимости от задачи и нормальности распределения данных использовали разные статистические тесты. Для сравнения двух групп использовали непарный t-тест в случае параметрических переменных и U-тест Манна–Уитни в случае непараметрических переменных. Для сравнения между несколькими группами использовался однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с *post-hoc* тестом Тьюки в случае параметрических переменных и тест Краскела–Уоллиса с тестом Данна для множественных сравнений в случае ненормально распределенных данных. $p < 0.05$ считали статистически значимым. Значения внутри группы выражены как средние \pm стандартная ошибка средней (SEM). Данные клинических пациентов были обработаны с использованием модулей Python NumPy, SciPy и Pandas. Для проверки линейных зависимостей мы использовали корреляционный тест Пирсона (на диаграммах показан коэффициент корреляции и соответствующее значение r). Для проверки различий в применении антибиотиков в группах мы использовали t-критерий неравных дисперсий Уэлча (на диаграммах показаны значения p , где это применимо).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Подбор экспериментального дизайна модели фототромбоза почки.

Для адаптации модели фототромбоза для почки необходимо было выбрать оптимальное время освещения лазером. Были проведены опыты с длительностью освещения почки 2, 5 или 10 минут. Размер очага повреждения оценивали с помощью окрашивания тетразолия хлоридом (ТТС). При освещении почки лазером в течение 2 минут развивался чуть меньший и менее выраженный очаг (Рис. 1А) по сравнению с временем освещения 5 или 10 минут (Рис. 1Б, В), в связи с чем для последующих экспериментов была выбрана продолжительность воздействия лазера 10 минут. Также тестировали другой способ варьирования размера очага, а именно провели сравнение двух источников освещения с

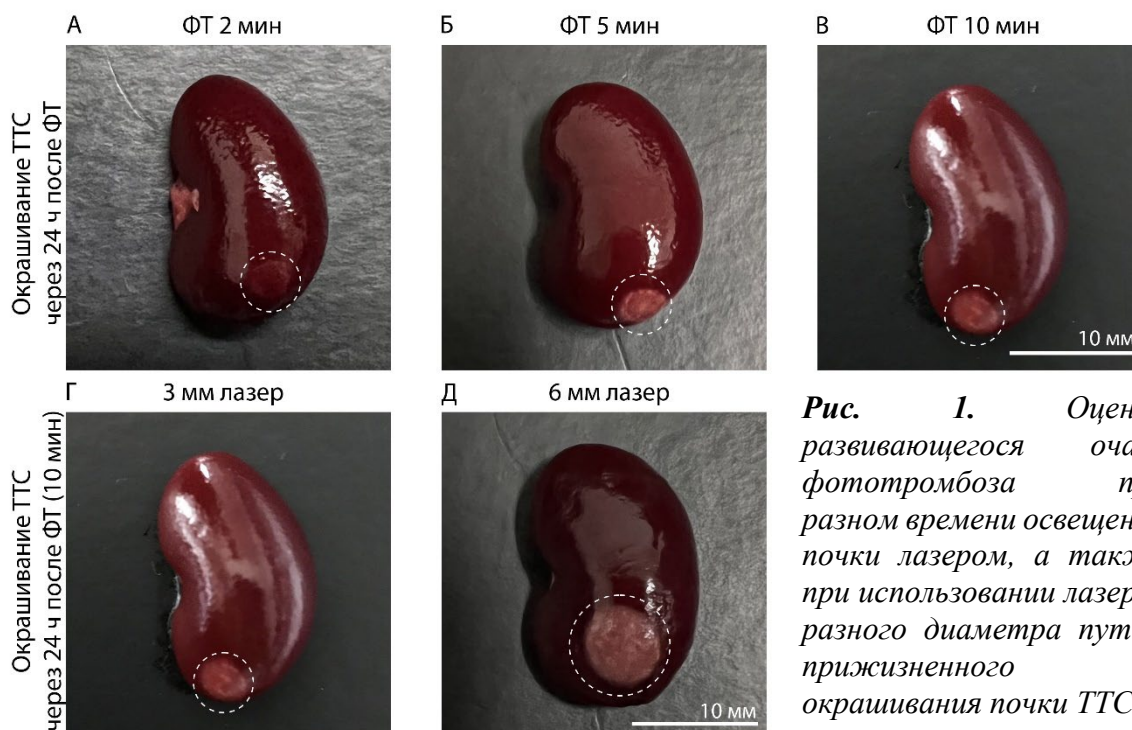


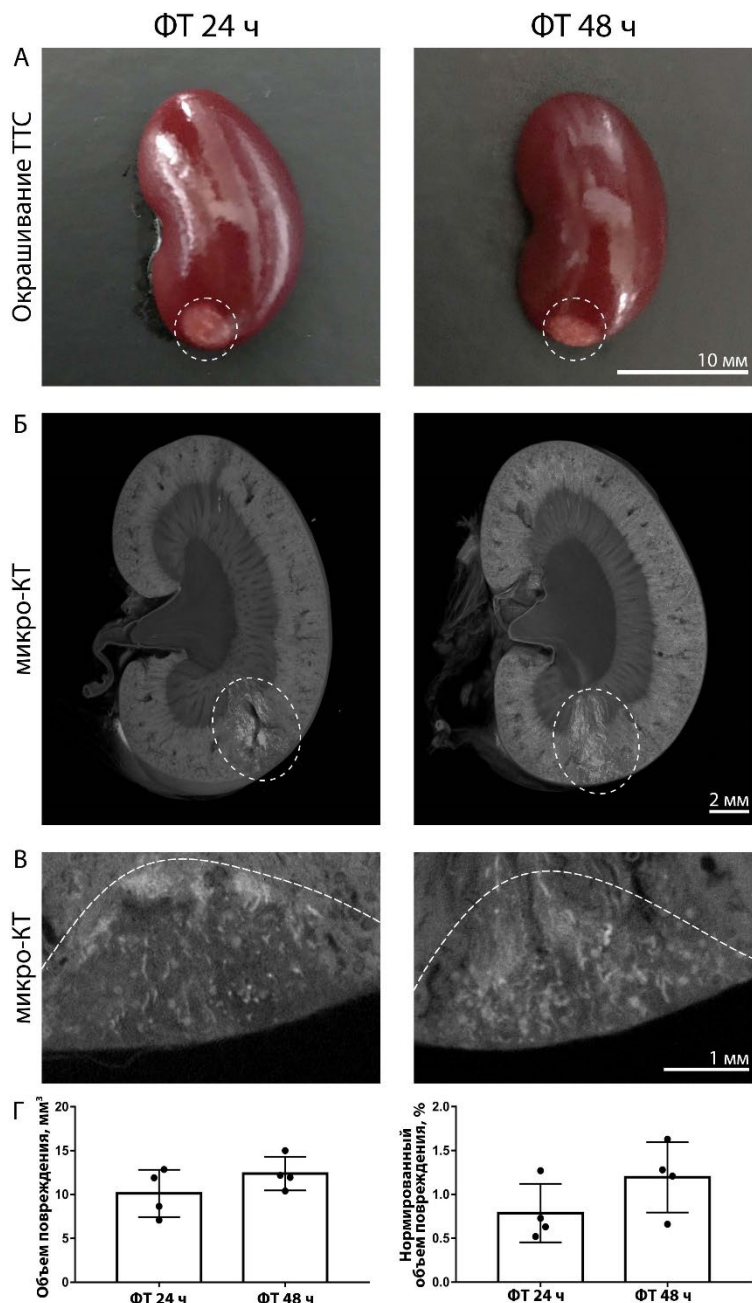
Рис. 1. Оценка развивающегося очага фототромбоза при разном времени освещения почки лазером, а также при использовании лазеров разного диаметра путем прижизненного окрашивания почки ТТС.

диаметрами луча 3 и 6 мм, и продемонстрировали развитие очагов повреждения разного размера (Рис. 1).

Макроскопические изменения в зоне очага фототромбоза и способы его визуализации

Первичную оценку развивающегося при фототромбозе почки повреждения проводили с помощью окрашивания ТТС и микрокомпьютерной томографии (микро-КТ). Как через 24, так и через 48 часов после фототромбоза визуализируется очаг, состоящий из мертвых клеток. Точный объем очага был оценен с помощью метода микро-КТ и составил примерно 1% от объема всей почки (Рис. 2).

Рис. 2. Оценка жизнеспособности клеток с помощью окрашивания прижизненных срезов почки ТТС и морфология поврежденного очага. А, Окрашивание почек ТТС через 24 и 48 часов после индукции фототромбоза. Б, Микро-КТ целой почки и В, увеличенный вид очага через 24 и 48 часов после индукции фототромбоза.



Гистологические изменения в зоне очага фототромбоза

Для оценки морфологических изменений в очаге фототромбоза мы выполнили окрашивание срезов почек гематоксилином-эозином (ГЭ) и иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против β -актина (Рис. 3А, В). Было показано явное отличие в интенсивности окрашивания поврежденной и здоровой ткани как через 24, так и через 48 часов после ФТ и продемонстрирована четкая граница визуализации очага. Реакция с Шифф-йодной кислотой выявила накопление ШИК-положительных масс в канальцах поврежденного очага и прилегающих тканях (Рис. 3Б).

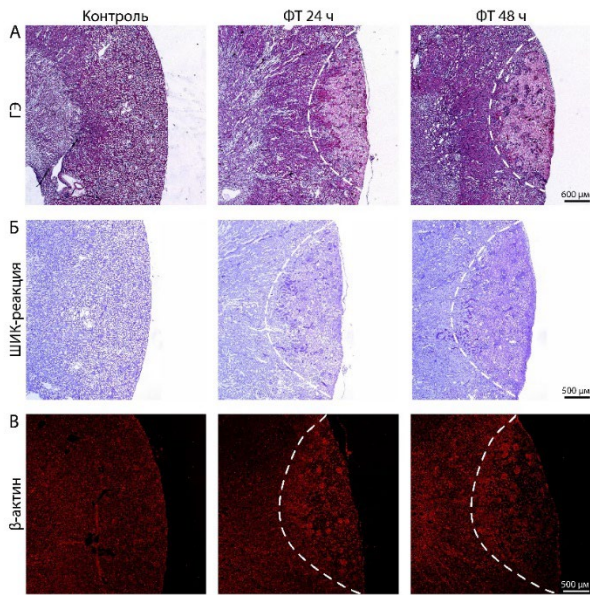
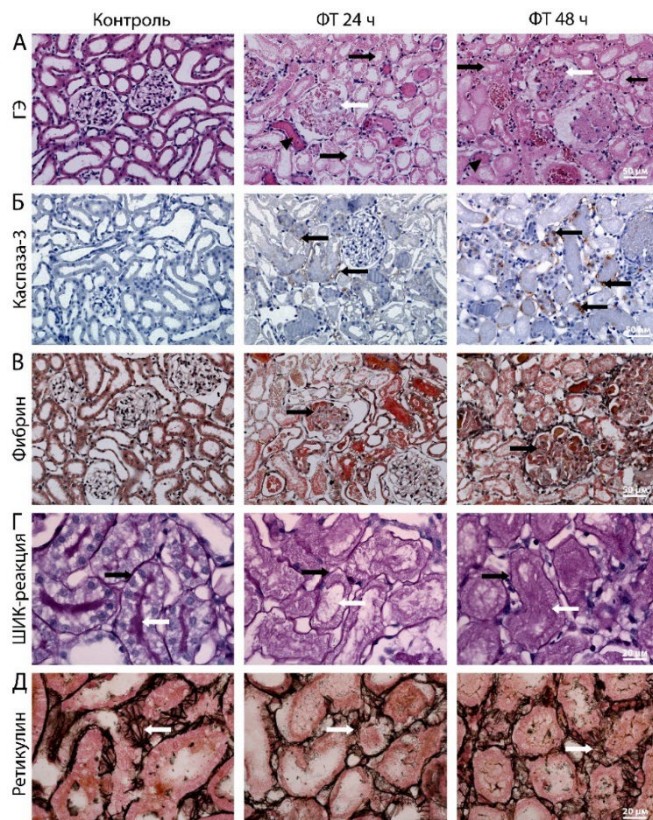


Рис. 3. Морфологические изменения в зоне повреждения, развившегося в результате фототромбоза сосудов почки, и вокруг очага. А, Окрашивание почек гематоксилином-эозином. Б, ШИК-реакция интактных и поврежденных почек. В, Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против β -актина. Пунктиром показана ишемизированная зона.

Внутри ишемизированной области с помощью окрашивания ГЭ мы обнаружили сильно поврежденные каналцы (черные стрелки) и клубочки (белые стрелки) через 24 и 48 ч после фототромбоза (рис. 4А), а также гиалиновые

цилиндры. Было показано, что некоторые канальцевые клетки потеряли свои ядра и щеточную каемку, а также были положительными при окрашивании на активированную каспазу-3, которая является маркером апоптотической гибели клеток (рис. 4Б). Кроме того, фототромбоз приводил к накоплению фибрина в сосудах (окрашивание Martius yellow-brilliant crystal scarlet-methyl blue), что было интерпретировано как тромбоз (рис. 4В). В очаге инфаркта наблюдалось нарушение нормальной морфологии щеточной каемки, но сохранялась морфологическая структура базальных мембран, что было выявлено при проведении ШИК-реакции (рис. 3Б, 4Г). Окрашивание против β -актина подтвердило потерю щеточных каемок и разрушение канальцев в очаге ФТ (рис. 3В). Окрашивание на ретикулин выявило небольшую дезорганизацию внеклеточного матрикса в поврежденном очаге (рис. 4Д). Таким образом, было показано нарушение нормальной морфологии ткани почки, разрушение щеточных каемок канальцев, апоптотическая гибель клеток, реорганизация внеклеточного матрикса в очаге повреждения.

Рис. 4. Морфологические изменения в зоне очага фототромбоза и в прилегающих областях. А, ГЭ Б, Окрашивание против каспазы-3. В, MSB окрашивание. Г, ШИК-реакция. Д, Окрашивание Gordon-Sweets на ретикулин.



Фотоиндуцированный тромбоз сосудов почки приводил к повышению уровня маркеров повреждения и пролиферации

Далее в работе оценивали маркеры повреждения и пролиферации с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания. Было показано, что через 24 и 48 часов после ФТ повышалась экспрессия молекулы повреждения почек 1 (KIM-1) на границе поврежденной и здоровой ткани (Рис. 5Б, Г). Также выявлено значительное увеличение количества PCNA-позитивных клеток через 24 ч ($5,9 \% \pm 0,32 \%$) и 48 ч ($17,9 \% \pm 1,90 \%$) после повреждения, вызванного фототромбозом, по сравнению с контрольной группой ($0,7 \% \pm 0,07 \%$) (рис. 5Д). При двойном окрашивании мы обнаружили, что экспрессия PCNA была в основном колокализована с KIM-1-положительными каналцами (рис. 5Б,В).

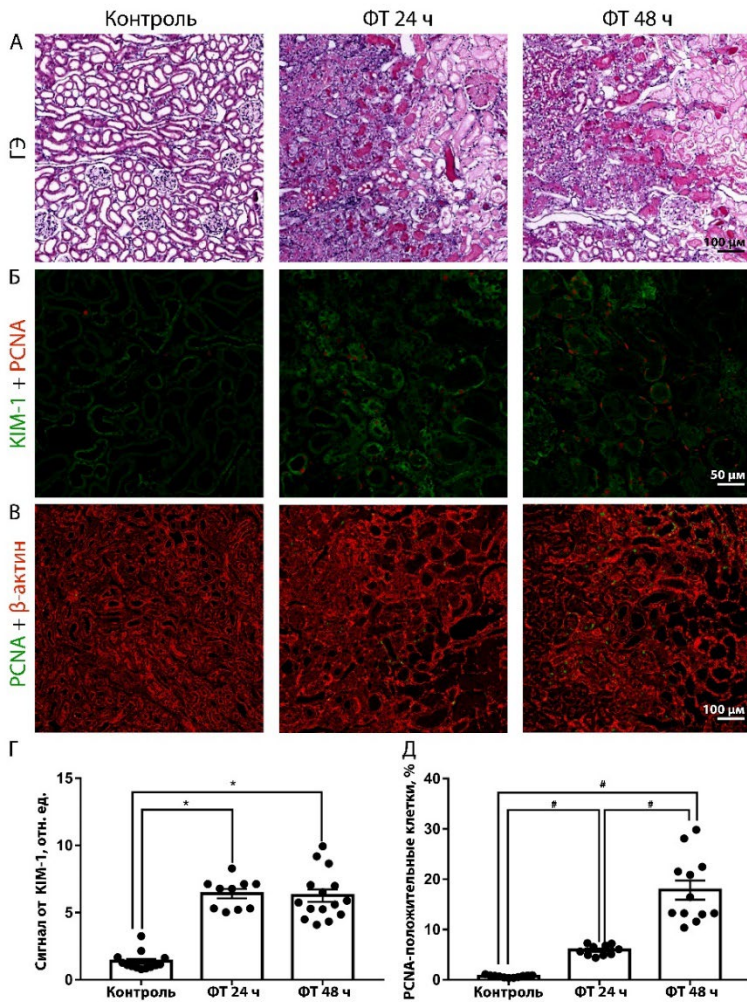


Рис. 5. Динамика экспрессии маркера повреждения и пролиферации в зоне очага фототромбоза и на границе поврежденной и здоровой ткани. А, ГЭ. Б, Маркер почечного повреждения (KIM-1, зеленый) и маркер пролиферации (PCNA, красный). В, Маркер цитоскелета (β -актин, красный) и маркер пролиферации (PCNA, зеленый). Г, количественный анализ экспрессии KIM-1 на срезах почки в контроле и после ФТ (24 и 48 часов). Д, Число PCNA-положительных ядер нормализованное на общее количество клеток, оцененное при окрашивании DAPI. * $p < 0.05$ (однофакторный дисперсионный анализ с использованием теста множественных сравнений Тьюки), # $p < 0.05$ (теста Краскела-Уоллиса с использованием теста множественных сравнений Данна).

Фототромбоз вызвал почечную дисфункцию

Далее оценивали тяжесть развивающегося ОПП (протокол индукции ФТ с лазером меньшего диаметра). Креатинин и мочевина в сыворотке крови после ФТ не повышались (Рис. 6А,Б), однако наблюдалось статистически значимое повышение маркера NGAL как более чувствительного маркера почечного повреждения через 6 часов после ФТ (Рис. 6В), через 24 часа после ФТ уровень данного маркера уже снижался, а через 48 часов возвращался к уровню контроля (Рис. 6Г).

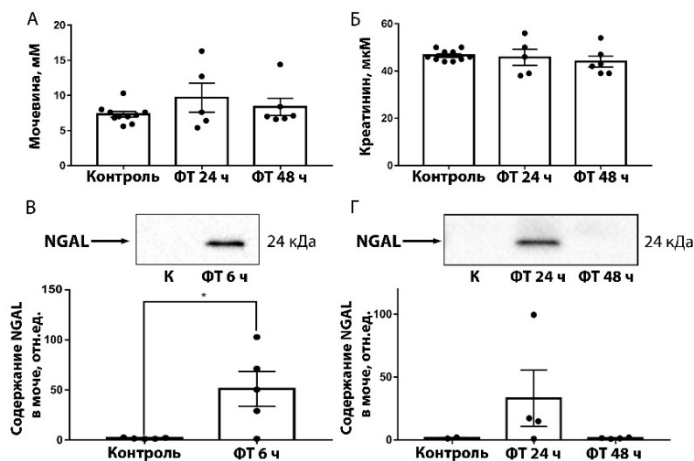
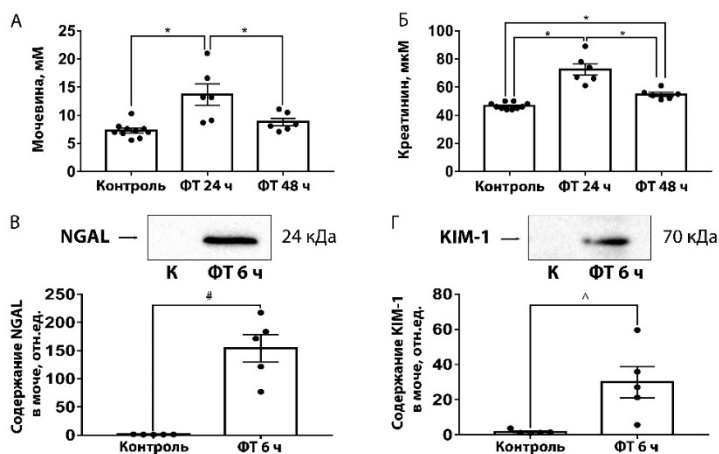


Рис. 6. Оценка маркеров почечной дисфункции и почечного повреждения. А, Концентрация мочевины (BUN) через 24 и 48 часов после индукции фототромбоза. Б, Концентрация креатинина (SCr) через 24 и 48 часов после индукции фототромбоза. В, Уровень NGAL в моче через 6 часов после индукции ФТ. Г, Уровень NGAL в моче через 24 и 48 часов после индукции фототромбоза, измеренный с помощью вестерн-блоттинга. * $p < 0.05$ (непарный t -test)

Для увеличения тяжести ОПП, которое можно было бы детектировать с помощью конвенциональных маркеров дисфункции почки, использовали источник света с большим диаметром луча и проводили нефрэктомии контралатеральной почки. При использовании модифицированной модели было выявлено статистически значимое повышение креатинина и мочевины в крови через 24 часа после индукции повреждения (Рис. 7А,Б). Уровень данных маркеров несколько снижался через 48 часов после индукции повреждения, однако уровень креатинина все еще оставался высоким. Уровень маркеров NGAL и KIM-1 в моче через 6 часов после повреждения также достоверно повышался (Рис. 7В,Г).

Рис. 7. Оценка маркеров ОПП в модифицированной модели ФТ. А, Концентрация BUN через 24 и 48 часов после ФТ. Б, Концентрация SCr через 24 и 48 часов после ФТ. В, Уровень NGAL или Г, KIM-1 в моче через 6 часов после ФТ. * $p < 0.05$ (One-way ANOVA с тестом Тьюки), # $p < 0.05$ (U-критерий Манна-Уитни), ^ $p < 0.05$ (непарный t -test).



Мы также косвенно оценили повреждение почек с помощью теста на проницаемость сосудов с использованием синего красителя Эванса. После ФТ мы продемонстрировали, что краситель распространялся на ткани вблизи очага повреждения как через 24, так и через 48 ч после ФТ, что указывает на повышенную проницаемость сосудов (Рис.8).

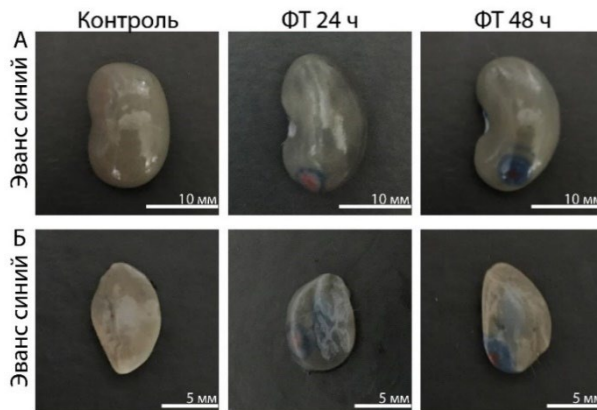
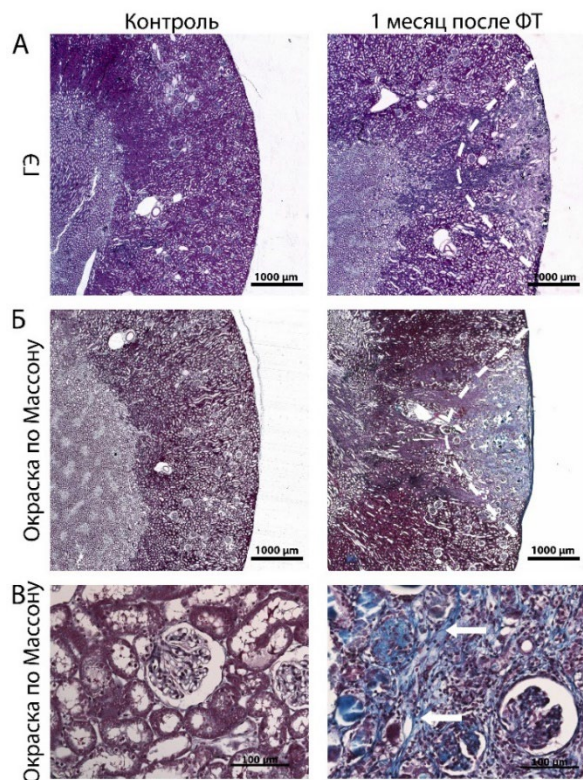


Рис. 8. Оценка проницаемости сосудов после ФТ-индуцированной ишемии почки. А, Вид целой почки. Б, срез почки.

Долгосрочные последствия фотоиндуцированной ишемии почки

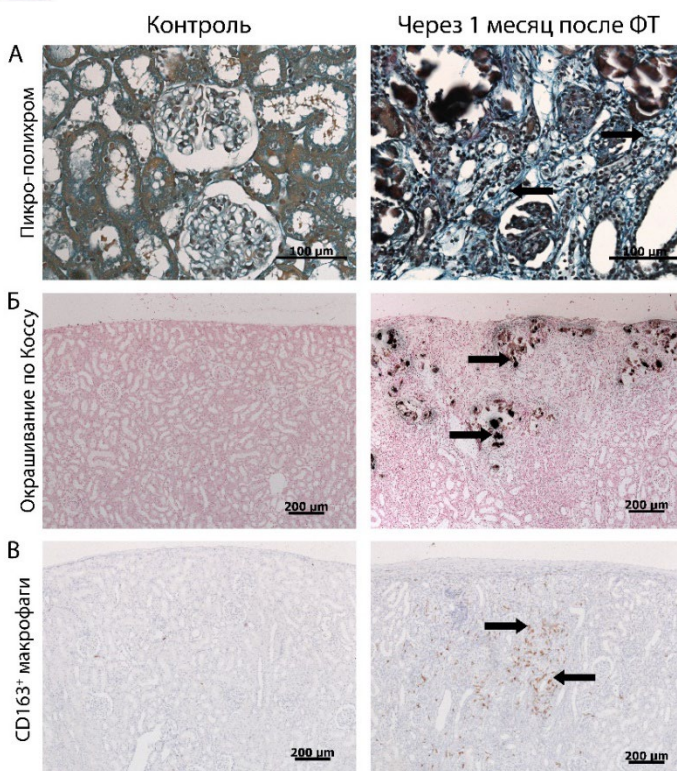
Для оценки отдаленных эффектов фототромбоза на почку мы окрашивали срезы ГЭ и продемонстрировали, что очаг повреждения с хорошо визуализируемой границей сохраняется и через 1 месяц после фототромбоза (рис. 9А). Мы обнаружили незрелые коллагеновые волокна в области инфаркта с помощью трихромного окрашивания Массона (окрашенных синим цветом) (рис. 9Б, В) и пикрополихромного окрашивания (рис. 10А). Мы также выявили значительную кальцификацию в очаге ФТ с помощью окрашивания по Коссу (рис. 10Б). В качестве дополнительного маркера фиброза и воспаления в почечной ткани мы оценили содержание $CD163^+$ макрофагов и наблюдали их присутствие в очаге ФТ и окружающей ткани (рис. 10В). Мы также провели микро-КТ почки через 1 месяц и показали небольшое уменьшение размера очага, что может быть связано с уменьшением отека или регенерацией ткани.



Для оценки отдаленных эффектов фототромбоза на почку мы оценили содержание $CD163^+$ макрофагов и наблюдали их присутствие в очаге ФТ и окружающей ткани (рис. 10В). Мы также провели микро-КТ почки через 1 месяц и показали небольшое уменьшение размера очага, что может быть связано с уменьшением отека или регенерацией ткани.

Рис. 9. Долгосрочные последствия ФТ. А, ГЭ в контроле и через месяц после ФТ. Б, Окрашивание трихром по Массону в контроле и через месяц после индукции фототромбоза. В, Окрашивание трихром по Массону в контроле и через месяц после индукции фототромбоза (белой стрелкой показаны коллагеновые волокна). Пунктиром показана ишемизированная зона

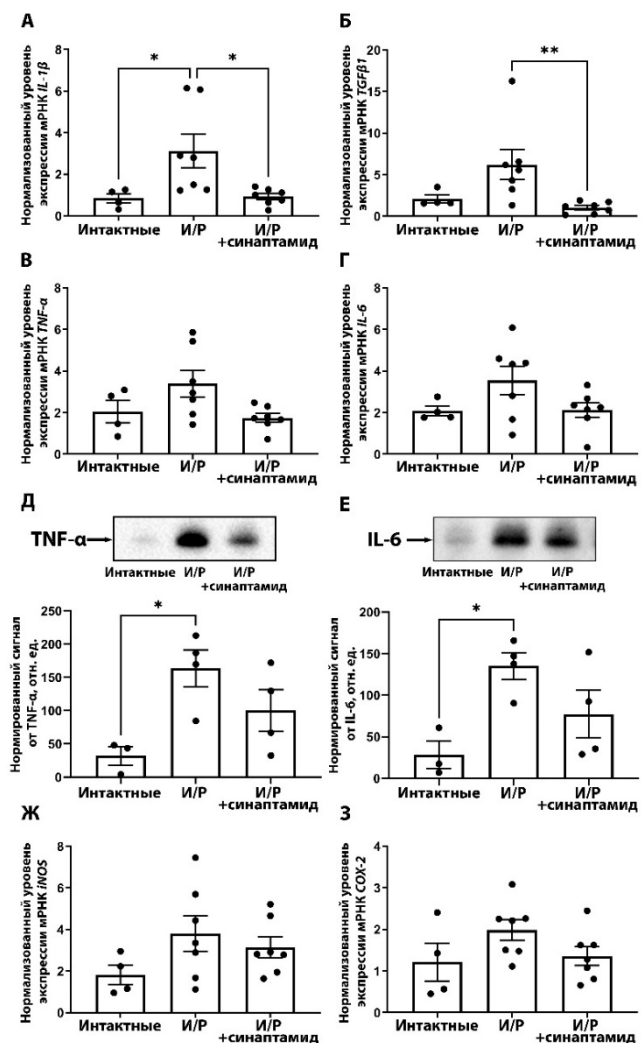
Рис. 10. Долгосрочные последствия фотоиндуцированной ишемии почки. А, Окрашивание срезов почек пикрополихромом в контроле и через месяц после индукции фототромбоза. Пунктиром показана ишемизированная зона. Шкала, 100 μ м. Б, Окрашивание по Коссу в контроле и через месяц после индукции фототромбоза. Пунктиром показана ишемизированная зона. Шкала, 200 μ м. В, Иммуногистохимическое окрашивание антителами против $CD163^+$ в контроле и через месяц после индукции фототромбоза (черными стрелками показаны $CD163^+$ макрофаги).



Синаптамид снижал воспаление в почечной ткани после ишемического повреждения

Известно, что одним из важных последствий ОПП является воспаление. Для изучения роли воспаления, а также для поиска возможных терапевтических агентов проводилось моделирование И/Р почки, сопряженное с терапией синаптамидом (производным омега-3 жирной кислоты, структурным аналогом анандамида) в течение 7 дней. При И/Р значительно повышалась экспрессия мРНК IL-1 β (Рис. 11А) и повышалась экспрессия TGF β 1 (Рис. 11Б). Лечение синаптамидом на фоне И/Р значимо снижало экспрессию данных факторов. Кроме того, мы оценивали экспрессию провоспалительных интерлейкинов TNF- α и IL-6, наблюдалась тенденция к повышению данных цитокинов при И/Р и снижение при лечении синаптамидом (Рис. 11В,Г). Уровень этих факторов мы также оценили с помощью вестерн-блоттинга и показали значительное увеличение при И/Р и тенденцию к снижению при лечении синаптамидом (Рис. 11Д,Е). Экспрессия iNOS немного повышалась при И/Р, а терапия синаптамидом не повлияла на ее экспрессию (Рис. 11Ж). Также наблюдалась тенденция к повышению COX-2 и тенденция к снижению при лечении синаптамидом (Рис. 11З).

Рис. 11. Уровни провоспалительных медиаторов после И/Р и лечения синаптамидом. (А) Экспрессия мРНК IL-1 β . (Б) Экспрессия мРНК TGF β 1. (В) Экспрессия мРНК TNF- α . (Г) Экспрессия мРНК IL-6. (Д) Нормализованный уровень TNF- α , измеренный с помощью вестерн-блоттинга. (Е) Нормализованный уровень IL-6, измеренный с помощью вестерн-блоттинга. (Ж) Экспрессия мРНК iNOS. (З) Экспрессия мРНК COX-2. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (однофакторный дисперсионный анализ с использованием теста множественных сравнений Тьюки или теста Краскела-Уоллиса с использованием теста множественных сравнений Данна).



Эффекты синаптамида на инфильтрацию лейкоцитов в ткань почки после ишемии

Мы также оценили инфильтрацию различных популяций лейкоцитов в ткань почки после И/Р и влияние терапии синаптамидом. Мы оценили экспрессию CD11a, который есть на всех лейкоцитах, и показали, что его

экспрессия значительно повышается при И/Р, а терапия синаптамидом снижает экспрессию данного маркера (Рис. 12А). Кроме того, наблюдалась тенденция к повышению экспрессии CD45 как в группе И/Р, так и в группе И/Р+синаптамид (Рис. 12Б). Маркер нейтрофилов CXCL1 в почке повышался как в группе И/Р, так и при терапии синаптамидом (Рис. 12В). Экспрессия маркера макрофагов CD68 также увеличивалась в обеих группах (Рис. 12Г), тем не менее, терапия синаптамидом на фоне ишемии снижала экспрессию CD86 (M1 макрофаги) (Рис. 12Д), а также увеличивала экспрессию CD163 (M2 макрофаги) (Рис. 12Е).

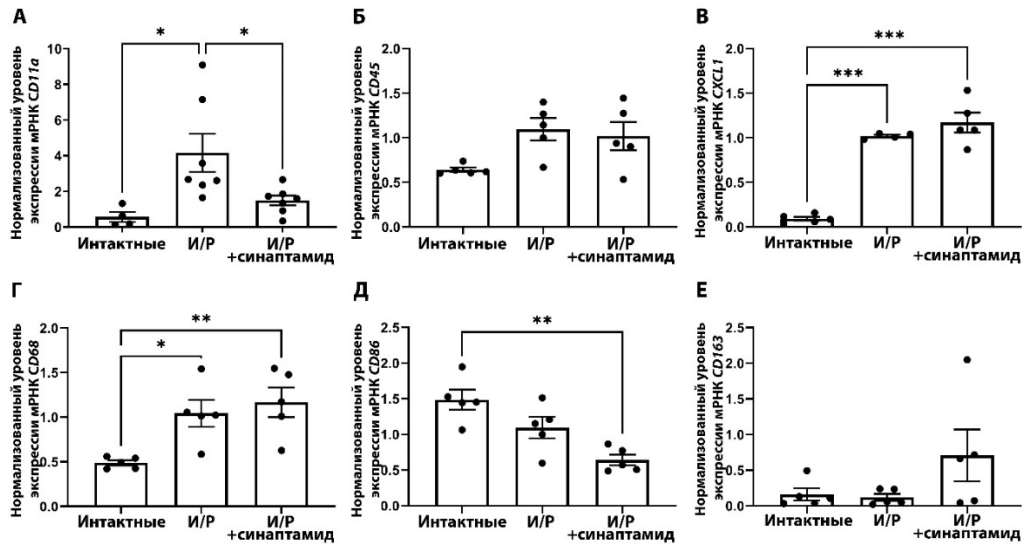


Рис. 12. Представленность различных популяций лейкоцитов в ткани почки после И/Р почек и лечения синаптамидом. (А) Экспрессия мРНК CD11a. (В) Экспрессия мРНК CD45. (С) Экспрессия мРНК CXCL1. (Д) Экспрессия мРНК CD68. (Е) Экспрессия мРНК CD86. (F) Экспрессия мРНК CD163. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (однофакторный ANOVA с множественным сравнением по Тьюки).

Нейтрофилы считаются ключевыми клетками, которые инфильтрируют в почку при И/Р, поэтому мы также оценили их количество с помощью гистологического анализа срезов почки. При ишемии наблюдается значительное повышение количества нейтрофилов в ткани почки (Рис. 13Б,Г), а при терапии синаптамидом наблюдается тенденция к его снижению (Рис. 13В,Г). Кроме того, на срезах также можно увидеть гиалиновые цилиндры и слущивание эпителиальных клеток, что свидетельствует о почечном повреждении (Рис. 13 Б,В).

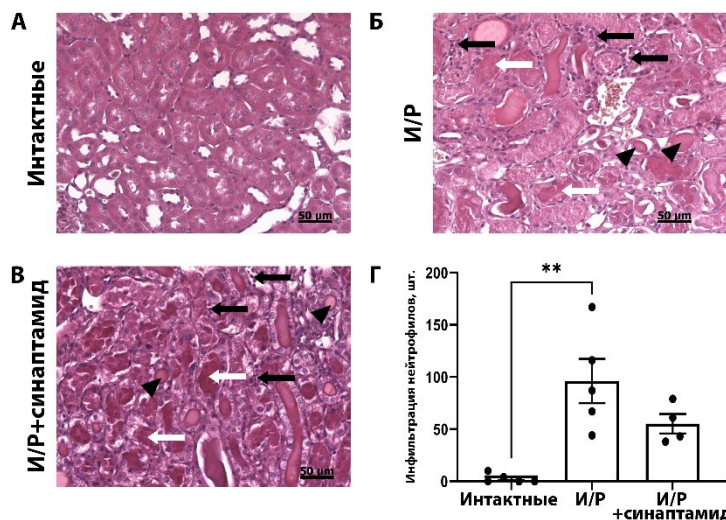


Рис. 13. Инфильтрация нейтрофилов в ткань почки после И/Р почки и лечения синаптамидом. Окрашивание срезов почек гематоксилин-эозином (H&E) интактных крыс (А), через 48 часов после ишемии/реперфузии (Б) или через 48 часов после ишемии/реперфузии с лечением синаптамидом (В). Нейтрофилы (черные стрелки), гиалиновые цилиндры (черные стрелки-указатели) и десквамация

эпителиальных клеток (белые стрелки) наблюдаются в почечной ткани после И/Р. (Г) Оценка количества нейтрофилов в почечной ткани интактных крыс, через 48 часов после ишемии/реперфузии или через 48 часов после ишемии/реперфузии с лечением синаптамидом. ** $p < 0,01$ (тест Краскела–Уоллиса с множественными сравнениями по Данну).

Для оценки инфильтрации мы также использовали проточную цитометрию и обнаружили инфильтрацию CD11b/c-положительных клеток, представленных в основном нейтрофилами и макрофагами, в ткань почки после И/Р и после терапии синаптамидом (Рис. 14).

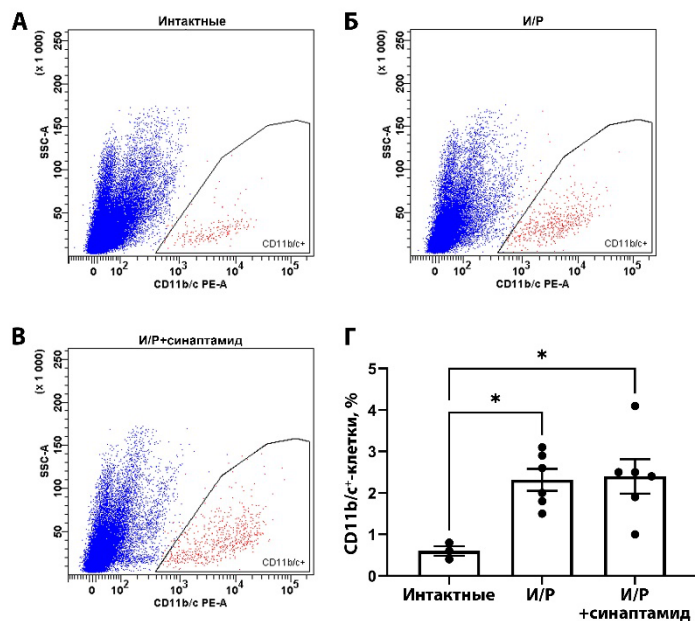


Рис. 14. Инфильтрация CD11b/c⁺ клеток в ткань почки после И/Р почек и лечения синаптамидом. Проточная цитометрия клеток, полученных из почек интактных крыс (А), через 48 часов после ишемии/реперфузии (В) или через 48 часов после ишемии/реперфузии с лечением синаптамидом (С), окрашенных флуоресцентно-мечеными антителами против CD11b/c⁺. (D) Содержание CD11b/c⁺ клеток в почках через 48 часов после И/Р. * $p < 0,05$ (однофакторный ANOVA с множественным сравнением по Тьюки).

Синаптамид оказывает свое противовоспалительное действие через рецептор GPR110 нейтрофилов

Мы оценили экспрессию предполагаемого рецептора синаптамида GPR110 в ткани всей почки и обнаружили, что она повышается при И/Р и терапии синаптамидом (Рис. 15А). Экспрессия данного рецептора в CD11b/c⁺ клетках также повышалась при И/Р и терапии синаптамидом (Рис. 15Б). Одновременно, при И/Р в CD11b/c⁺ клетках повышалась экспрессия TNF- α , а терапия синаптамидом снижала данную экспрессию (Рис. 15В). Для уровня другого провоспалительного цитокина IL-1 β , оцененного в этих клетках, наблюдаются аналогичные тенденции (Рис. 15Г). Чтобы более детально разобраться, с помощью каких иммунных клеток реализуются эффекты синаптамида, мы сравнили экспрессию GPR110 в выделенных из интактных крыс клетках CD11b/c⁺ (нейтрофилы и макрофаги) с экспрессией в мононуклеарах крови, и увидели, что этот рецептор не экспрессируется на мононуклеарах периферической крови (Рис. 15Д). При этом, терапия синаптамидом не снижала экспрессию TNF- α в мононуклеарах (Рис. 15Е). В связи с этим мы предполагаем, что противовоспалительный эффект синаптамида реализуется через GPR110 на нейтрофилах.

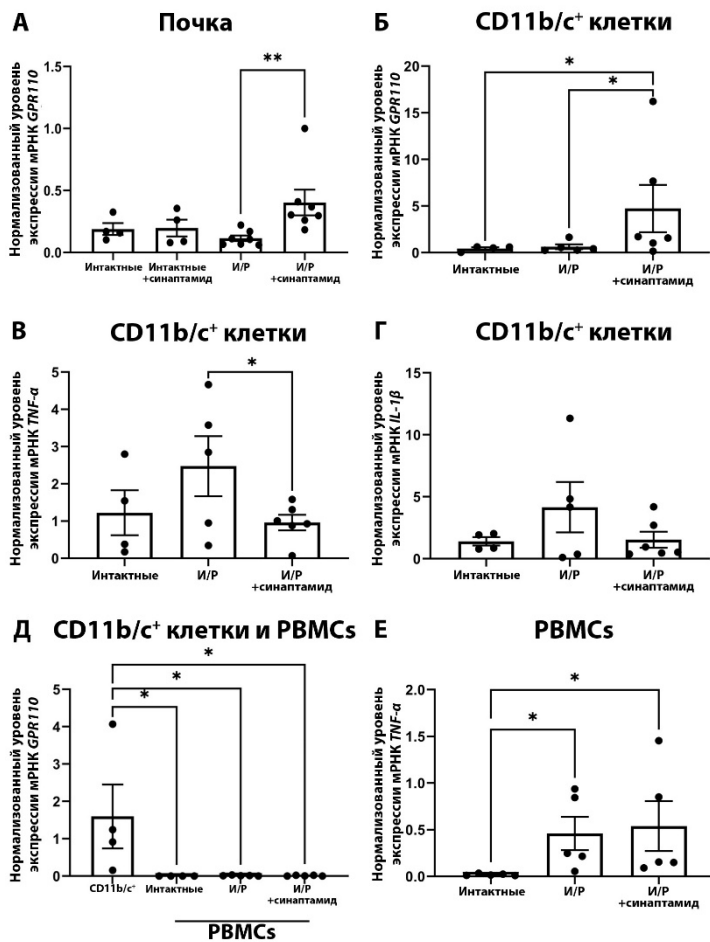


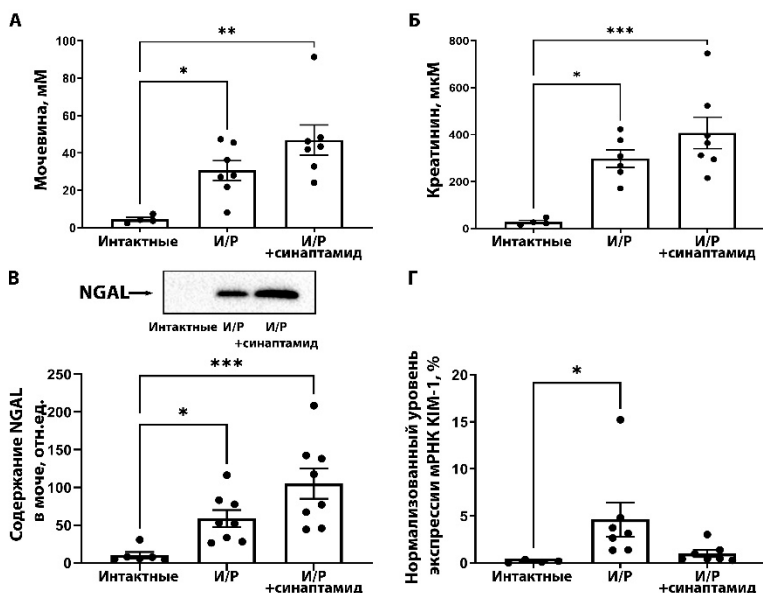
Рис. 15. Связанные с GPR110 противовоспалительные эффекты синаптамида при ишемии/реперфузии почек. (А) Экспрессия мРНК GPR110 в ткани почки. (Б) Экспрессия мРНК GPR110 в CD11b/c+ клетках из почки. (В) Экспрессия мРНК TNF-α в CD11b/c+ клетках из ткани почки. (Г) Экспрессия мРНК IL-1β в CD11b/c+ клетках из ткани почки. (Д) Сравнение экспрессии мРНК GPR110 в CD11b/c+ клетках из интактной почечной ткани и PBMCs, полученных из крови интактных крыс, через 48 часов после ишемии/реперфузии или через 48 часов после ишемии/реперфузии с лечением синаптамидом. (Е) Экспрессия мРНК TNF-α в PBMCs. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (однофакторный ANOVA с множественным сравнением по Тьюки или тест Краскела–Уоллиса с множественными сравнениями по Данну).

Эффекты синаптамида на тяжесть ОПП

Мы также оценили тяжесть развивающегося вследствие И/Р-почечного повреждения и обнаружили, что как при И/Р, так и при терапии синаптамидом наблюдается значительное повышение мочевины и креатинина в сыворотке крови (Рис. 16 А,Б) и NGAL в моче (Рис. 16В). В ткани почки мы также оценили экспрессию другого маркера ОПП KIM-1 и обнаружили, что И/Р вызывает повышение его экспрессии, а терапия синаптамидом продемонстрировала

тенденцию к его снижению (Рис. 16Г). Таким образом, лечение синаптамидом в выбранном терапевтическом режиме и дозе не снижало ОПП.

Рис. 16. Оценка тяжести ОПП у крыс после И/Р и лечения синаптамидом. (А) Уровень BUN или (Б) SCR (48 часов после И/Р). (С) Уровни NGAL в моче через 24 часа после И/Р. (Д) Экспрессия мРНК KIM-1 через 48 часов после И/Р. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,01$ (однофакторный ANOVA с множественным сравнением по Тьюки или тест Краскела–Уоллиса с множественными сравнениями по Данну).



множественным сравнением по Тьюки или тест Краскела–Уоллиса с множественными сравнениями по Данну).

Оценка функции почек при ОПП, вызванном сепсисом, при экспериментальном моделировании и у пациентов

В экспериментах на новорожденных крысах мы показали, что введение ЛПС увеличивало концентрацию BUN более чем в 2 раза через сутки после инъекции, что можно рассматривать как легкое ОПП. Терапия гентамицином значительно снизила уровень BUN по сравнению с группой, получавшей только ЛПС, что указывает на неожиданный нефропротекторный эффект гентамицина (Рис. 17А). Мы также выявили увеличение уровней NGAL и KIM-1 в моче, которые являются дополнительными биомаркерами повреждения почек (Рис. 17Б,В). Лечение гентамицином также приводило к некоторому снижению уровня этих маркеров в моче.

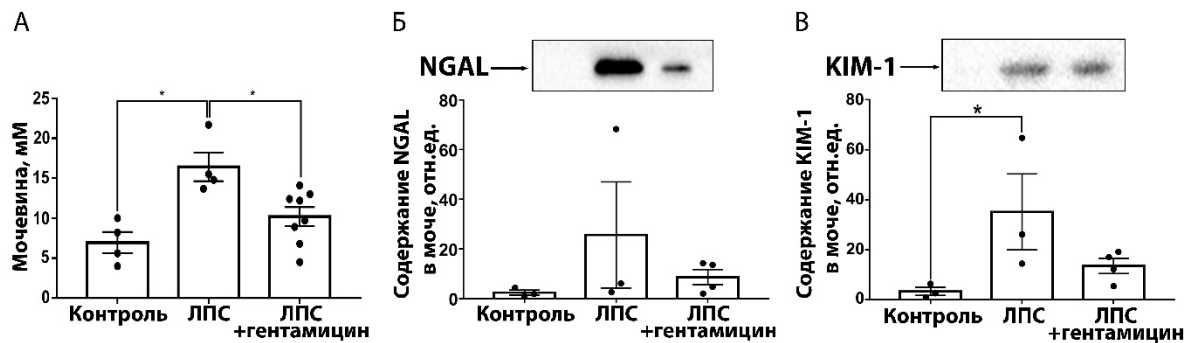


Рис. 17. Влияние терапии гентамицином на тяжесть ОПП у новорожденных крыс с системным воспалением. (А) Концентрация BUN в крови. * p -значение $< 0,05$ (ANOVA с использованием теста множественных сравнений Тьюки). (Б) Уровень NGAL в моче, измеренный методом вестерн-блоттинга. (В) Уровень KIM-1 в моче, измеренный методом вестерн-блоттинга. * p -значение $< 0,05$ (тест Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями по Данну).

Также мы провели биоинформатический анализ данных полученных от новорожденных пациентов отделения хирургии новорожденных и показали, что наблюдается положительная корреляция между уровнем мочевины и С-реактивного белка в когорте всех пациентов (Рис. 18А). Похожая картинка наблюдается при анализе группы пациентов с признаками сепсиса, при этом пациенты без сепсиса не демонстрировали такой корреляции (Рис. 18Б,В). Таким образом, более высокие уровни С-реактивного белка были ассоциированы с развитием более тяжелого ОПП у пациентов в клинике.

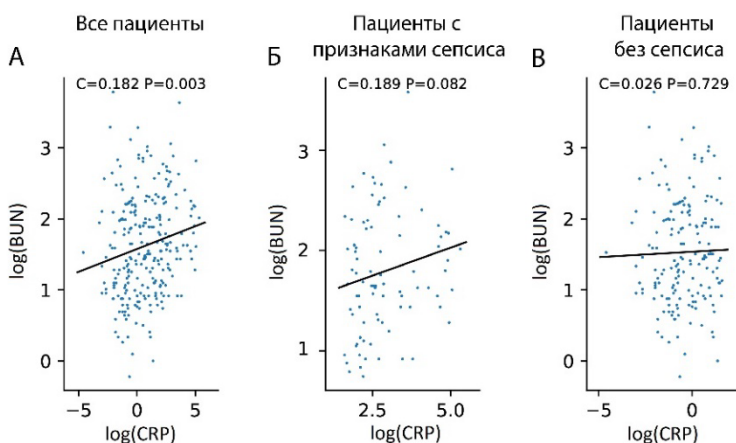


Рис. 18. Эффект сепсиса на маркеры ОПП. (А-В) Корреляция уровня мочевины в сыворотке с концентрацией маркера системного воспаления С-реактивного белка у (А) всех пациентов, (Б) пациентов с признаками сепсиса или (В) без них. Коэффициенты корреляции и p -values показаны над графиками.

Кроме того, было проанализировано положительное или отрицательное влияние специфических антибиотиков на концентрацию мочевины в сыворотке у новорожденных детей с признаками сепсиса (рис. 19). Мы показали, что терапия ампициллином в комбинации с сульбактамом или метронидазолом достоверно коррелировала со снижением концентрации мочевины (Рис. 19). И наоборот, терапия цефепимом, линезолидом или имипенемом в комбинации с циластатином коррелировала с повышением уровня мочевины в сыворотке. Таким образом, некоторые антибиотики улучшали функцию почек, в то время как другие усугубляли тяжесть ОПП.

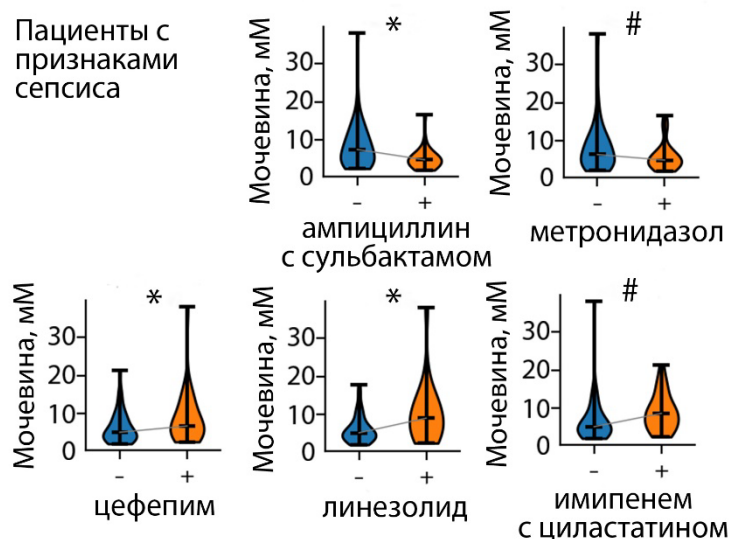


Рис. 19. Эффект терапии антибиотиками на маркеры ОПП у пациентов с подозрением на сепсис. Уровень BUN в сыворотке у пациентов, не получавших (синий столбик) или получавших (оранжевый столбик) определенный антибиотик. * p -value < 0.05, # p -value < 0.1 (t-test).

Заключение

Данная диссертационная работа была посвящена изучению ключевых механизмов ОПП с целью поиска потенциальных подходов к нефропротекции. Поскольку ОПП может происходить при различных патологических стимулах в работе было проанализировано несколько экспериментальных моделей, которые могут помочь охарактеризовать почечное повреждение с различных сторон. Роль воспалительных процессов была проанализирована при ишемии/реперфузии почки и при развитии системного воспаления. А для изучения локальной ишемии почки был разработан новый экспериментальный подход к моделированию повреждения почки, основанный на фотоиндуцированном тромбозе.

Разработанная модель ишемии почек, вызванной фототромбозом, позволили получить воспроизводимую область повреждения с предсказуемым расположением и разграничением между поврежденными и здоровыми тканями, и исследовать процессы регенерации, воспаления и фиброза, происходящие в этой зоне. Было выявлено выраженное нарушение морфологии почечной ткани, изменение проницаемости сосудов, повышение пролиферации клеток на границе поврежденной и здоровой ткани, а также провоспалительные изменения.

Дальнейшее изучение роли воспаления в модели ишемии/реперфузии почки выявили повышение уровней провоспалительных цитокинов, сопровождающееся инфильтрацией иммунных клеток. В этих условиях применение противовоспалительного соединения синаптамида, структурного аналога эндогенного лиганда каннабиноидного рецептора анандамида, приводило к снижению экспрессии цитокинов IL-1 β и TGF β 1 в почечной ткани и в иммунных клетках, инфильтрирующих почечную ткань после ишемии.

Предложен механизм реализации этого эффекта синаптамида через рецептор GPR110 на нейтрофилах.

Универсальность роли воспалительного ответа в развитии ОПП продемонстрирована на модели системного воспаления у неонатальных крыс и в дальнейшем подтверждена на клиническом материале у новорожденных детей с признаками сепсиса. Показано развитие ОПП у новорожденных с признаками сепсиса и впервые изучено влияние терапии антибиотиками на течение ОПП при системном воспалении. Выявлены антибиотики, оказывавшие благоприятное влияние на функцию почек и снижавшие маркеры ОПП, и наоборот, повышавшие тяжесть ОПП при сепсисе, что имеет важное клиническое значение.

Таким образом, данная диссертационная работа представляет собой комплексное исследование механизмов ОПП различного генеза, выявление универсальных механизмов развития и потенциальных нефропротекторных стратегий.

ВЫВОДЫ

1. Локальная ишемия почки в результате фотоиндуцированного тромбоза сосудов приводит к формированию очага повреждения, с выраженным нарушением морфологии почечной ткани, изменением проницаемости сосудов, гибелью почечных клеток в острой фазе, а также отложением коллагеновых волокон и привлечением противовоспалительных макрофагов в отдаленный период.
2. Ишемически-реперфузионное повреждение почки приводит к инфильтрации иммунных клеток в ткань почки, основными популяциями среди которых являются CD11a-, CD68- и CXCL1-положительные клетки, а также повышению в ткани почки маркеров воспаления, таких как TNF- α , IL-6 и IL-1 β .
3. Введение синаптамида приводит к выраженному противовоспалительному эффекту, и реализуется предположительно через рецептор GPR110 на нейтрофилах, однако не снижает тяжесть ОПП.
4. ЛПС-индуцированное системное воспаление у новорожденных крыс приводило к развитию ОПП, выражающемуся в повышении уровня мочевины в сыворотке и NGAL в моче, а признаки сепсиса у новорожденных пациентов в клинике были ассоциированы усугублением тяжести ОПП, оцененному по уровню мочевины.
5. Определены антибиотики, положительно влияющие на функцию почек при системном воспалении, в частности, гентамицин снижал тяжесть ЛПС-индуцированного ОПП у новорожденных крыс, а ампициллин в комбинации с сульбактамом или метронидазол снижал маркеры ОПП у пациентов с подозрением на сепсис.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, Web of Science (WoS), RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных:

1. **Brezgunova A.A.**, Andrianova N. V., Popkov V.A., Tkachev S.Y., Manskikh V.N., Pevzner I.B., Zorova L.D., Timashev P.S., Silachev D.N., Zorov D.B., Plotnikov E.Y. New experimental model of kidney injury: Photothrombosis-induced kidney ischemia // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2023. Т. 1869. № 3. С. 166622. (JIF - 4,2, WoS) (0,81/0,4)*
2. **Brezgunova A.A.**, Andrianova N. V., Saidova A.A., Potashnikova D.M., Abramicheva P.A., Manskikh V.N., Mariasina S.S., Pevzner I.B., Zorova L.D., Manzhulo I. V., Zorov D.B., Plotnikov E.Y. Anti-Inflammatory Effect of Synaptamide in Ischemic Acute Kidney Injury and

the Role of G-Protein-Coupled Receptor 110 // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. T. 25. № 3. C. 1500. (JIF - 4,9, WoS) (1,13/0,57)*

3. Pevzner I.B., **Brezgunova A.A.**, Popkov V.A., Sintsov M.Y., Andrianova N. V., Zorova L.D., Silachev D.N., Burov A.A., Podurovskaya Y.L., Zorov D.B., Plotnikov E.Y., Sukhikh G.T. The effects of antibiotic therapy on neonatal sepsis-associated acute kidney injury // *Life Sci.* 2024. T. 338. C. 122359. (JIF - 5,2, WoS) (0,69/0,3)*

4. Andrianova N. V., **Brezgunova A.A.**, Buyan M.I., Makievskaya C.I., Buyan A.I., Cherkesova K.S., Pevzner I.B., Zorova L.D., Zorov D.B., Plotnikov E.Y., Popkov V.A. Sex-Specific Effects of Estradiol and Progesterone in Ischemic Kidney Injury // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. T. 25. № 6. C. 3155. (JIF - 4,9, WoS) (1/0,4)*

5. Plotnikov E.Y., **Brezgunova A.A.**, Pevzner I.B., Zorova L.D., Manskikh V.N., Popkov V.A., Silachev D.N., Zorov D.B. Mechanisms of LPS-induced acute kidney injury in neonatal and adult rats // *Antioxidants.* 2018. T. 7. № 8. C. 105. (JIF - 6, WoS) (0,69/0,3)*

6. Nesterova V. V., Babenkova P.I., **Brezgunova A.A.**, Samoylova N.A., Sadovnikova I.S., Semenovich D.S., Andrianova N. V., Gureev A.P., Plotnikov E.Y. Differences in the Effect of Beta-Hydroxybutyrate on the Mitochondrial Biogenesis, Oxidative Stress and Inflammation Markers in Tissues from Young and Old Rats // *Biochem.* 2024. T. 89. № 7. C. 1336–1348. (JIF - 2,3, WoS) (0,81/0,3)*

7. Певзнер И.Б., Павленко Т.А., Попков В.А., Андрианова Н.В., Зорова Л.Д., **Брезгунова А.А.**, Зоров С.Д., Янкаускас С.С., Силачев Д.Н., Зоров Д.Б., Плотников Е.Ю. Сравнение тяжести почечного повреждения у новорожденных и взрослых крыс при ишемии/реперфузии и введении эндотоксина // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2018. T. 165. № 2. C. 148–154. (IF – 0,898, РИНЦ) (0,44/0,15)*

8. Попков В.А., Буян М.И., Макиевская К.И., **Брезгунова А.А.**, Певзнер И.Б., Зорова Л.Д., Зоров Д.Б., Плотников Е.Ю., Андрианова Н.В. Функционирование митохондрий и их устойчивость к окислительному стрессу в почке при беременности // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2024. T. 177. № 4. C. 446–453. (IF – 0,906, РИНЦ) (0,5/0,15)*

* – Объем в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах

Список сокращений

BUN - мочевины

COX - циклооксигеназа

IL - интерлейкин

KIM – молекула повреждения почек

MSB - Martius yellow-brilliant crystal scarlet-methyl blue

NGAL - липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов

PBMC - мононуклеарные клетки периферической крови

PBS - фосфатно-солевой буфер

PCNA - ядерный антиген пролиферирующих клеток

PMSF - фенолметансульфонил фторид

PVDF - поливинилиденфторид

SB – буфер для образцов

SCR – сывороточный креатинин

SEM - стандартная ошибка среднего

TNF - фактор некроза опухоли

TTC - трифенилтетразолий хлорид

BSA – бычий сывороточный альбумин

ГЭ – гематоксилин-эозин

ИГФ - иммуногистофлуоресценция

И/Р – ишемия-реперфузия почки

ИФА – иммуноферментный анализ

КТ – компьютерная томография

ЛПС - липополисахарид
ОПП – острое почечное повреждение
ОТ-ПЦР – ПЦР с обратной транскрипцией
РНК – рибонуклеиновая кислота
ТТС – трифенилтетразолий хлорид
ФТ - фототромбоз
ХБП - хроническая болезнь почек
ШИК – реакция с Шифф-йодной кислотой