

УДК 612.062

## РАПАМИЦИН НЕ ОБЛАДАЕТ ЗАЩИТНЫМ ЭФФЕКТОМ ПРИ ОСТРОМ ПОЧЕЧНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ, ВЫЗВАННОМ ИШЕМИЕЙ ИЛИ ЦИСПЛАТИНОМ\*

© 2019 Н.В. Андрианова<sup>1,2</sup>, Л.Д. Зорова<sup>2,3</sup>, В.А. Бабенко<sup>2,3</sup>, И.Б. Певзнер<sup>2,3</sup>,  
В.А. Попков<sup>2,3</sup>, Д.Н. Силачев<sup>2,3</sup>, Е.Ю. Плотников<sup>2,3,4\*\*</sup>, Д.Б. Зоров<sup>2,3\*\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

<sup>2</sup> НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: plotnikov@belozersky.msu.ru, zorov@belozersky.msu.ru

<sup>3</sup> Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, 117997 Москва, Россия

<sup>4</sup> Институт молекулярной медицины, Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.06.2019

После доработки 12.07.2019

Принята к публикации 12.07.2019

Аутофагия играет важную роль в патогенезе острого почечного повреждения (ОПП). Показано, что хотя активация аутофагии связана с увеличением продолжительности жизни и защитными эффектами при разных патологиях, действие таких активаторов аутофагии, как рапамицин и его аналоги, на ОПП остается неясным. В данной работе исследовали действие рапамицина на модели ишемической и цисплатин-индуцированной острой почечной недостаточности как *in vivo*, так и *in vitro*. Эффекты рапамицина на функции почек *in vivo* на фоне ишемии/реперфузии (И/Р) или инъекции цисплатина оценивали по концентрации мочевины и креатинина в сыворотке крови и уровню маркера ОПП (белка NGAL) в моче. Эксперименты *in vitro* выполняли на первичной культуре эпителия почечных канальцев (ЭПК), которую подвергали действию кислородно-глюкозной депривации (КГД) или инкубации с цисплатином на фоне добавления различных концентраций рапамицина. Жизнеспособность клеток и скорость роста оценивали по МТТ-тесту, а также в режиме реального времени с помощью прибора RTCA iCELLigence. Обнаружено, что рапамицин не приводил к активации процесса аутофагии и не уменьшал тяжесть ишемического и цисплатин-индуцированного ОПП. Эксперименты на ЭПК показали, что рапамицин подавлял пролиферацию первичной культуры клеток и не обладал защитным действием при КГД или инкубации ЭПК с цисплатином. Впервые показано, что ингибитор mTOR рапамицин не приводил к защитному действию на почки при ОПП. Предполагается, что рапамицин нельзя считать идеальным миметиком ассоциированных с аутофагией процессов, для которых доказано нефропротекторное действие (например, ограничения калорийности питания), как это считали ранее. Защитное действие может быть более сложным и осуществляться через множество мишеней, связанных с аутофагией, а не ограничиваться исключительно ингибированием mTOR. Использование рапамицина и его аналогов для лечения разных форм ОПП требует дальнейшего изучения для более комплексного понимания его возможных положительных или отрицательных эффектов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** рапамицин, острое почечное повреждение, ишемия, цисплатин, эпителий почечных канальцев, аутофагия, нефропротекция.

DOI: 10.1134/S0320972519120091

Аутофагия является катаболическим процессом, направленным на элиминацию ненужных компартментов клетки, и, как следствие, ассоциированным с большей вероятностью выживания

клеток и органов при нормальных и неблагоприятных физиологических условиях. В настоящее время считается, что аутофагия принимает участие в патогенезе ряда заболеваний,

Принятые сокращения: ОПП – острое почечное повреждение; И/Р – ишемия/реперфузия; NGAL – липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов; ЭПК – эпителий почечных канальцев; КГД – кислородно-глюкозная депривация; mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; mTORC1 – комплекс 1 мишени рапамицина млекопитающих; ЛО – ложно оперированные; ДМСО – диметилсульфоксид; МТТ – метилтриазоловый тетразолий; ФБС – fetalная бычья сыворотка; ЭФР – эпидермальный фактор роста; ФСБ-Д – фосфатно-солевой раствор Дюльбекко; LC3 – ассоциированный с микротрубочками белок 1A/1B, легкая цепь 3.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», BM19-194, 23.09.2019.

\*\* Адресат для корреспонденции.

включая рак, некоторые нейродегенеративные, инфекционные заболевания и миопатии [1, 2]. Работы последних лет показали, что нарушение аутофагии митохондрий (митофагии) ускоряет процесс старения. Восстановление пула правильно функционирующих митохондрий у старых организмов путем нормализации процесса митофагии — перспективный метод борьбы с возрастным ухудшением функций органов, который в дальнейшем может быть использован как подход антивозрастной терапии [3, 4]. Аутофагия и митофагия также играют важную роль в ряде почечных патологий. Однако до сих пор нет устоявшегося мнения, несет ли аутофагия при ОПП исключительно защитную функцию или при определенных условиях может приводить к запуску патологических сигнальных каскадов.

Активация аутофагии и увеличение количества аутофагосом были показаны в ряде экспериментальных моделей ОПП. Например, активация процесса аутофагии была обнаружена в клетках почки *in vitro* и *in vivo* в модели цисплатин-индуцированной почечной недостаточности [5, 6]. И/Р тоже сопровождается увеличением количества аутофагосом в ткани почки [7, 8]. Кроме того, активация аутофагии была показана при септическом ОПП, вызванном инъекцией липополисахарида [9, 10] или перфорацией кишечника [11], а также при ОПП, вызванном введением радиоcontrastных веществ [12].

Используя различные экспериментальные модели на мышах с селективным нокаутом генов, ответственных за формирование аутофагосом (например, *Atg5* и *Atg7*) в проксимальных канальцах, было предположено, что активация аутофагии является скорее защитным механизмом в различных моделях ишемического, септического, цисплатин-индуцированного и гиперурикемического ОПП [7, 13, 14]. Недавно нами было показано, что ограничение калорийности питания, которое у молодых крыс характеризовалось ярко выраженными защитными свойствами, также сопровождалось активацией аутофагии [15].

С точки зрения фармакологии, важно найти вещества, которые могли бы активировать каскады аутофагии и повторять положительные эффекты ограничения калорийности питания и других подходов, стимулирующих аутофагию. Для некоторых таких веществ, действующих через схожие сигнальные пути, уже показано положительное влияние как на продолжительность жизни, так и на проявление некоторых заболеваний, в развитии которых аутофагия играет важную роль [16]. Одним из таких веществ считается рапамицин, применение которого

увеличивает продолжительность жизни некоторых животных и препятствует наступлению возрастных заболеваний путем замедления процесса старения [17]. Теоретически рапамицин можно было бы использовать для активации аутофагии в клетках почки при ОПП, что должно приводить к защите почечной ткани. Однако данные, касающиеся действия рапамицина при ОПП, доступные в настоящее время, довольно отрывочны и противоречивы и требуют более глубокого изучения.

В данной работе было исследовано действие рапамицина в двух наиболее изученных моделях ОПП, ишемии/реперфузии почки и цисплатин-индуцированной нефротоксичности. Эксперименты проводили как *in vivo* на молодых крысах, так и *in vitro* на первичной культуре эпителия почечных канальцев (ЭПК).

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Лабораторные животные.** В работе в качестве лабораторных животных использовали молодых беспородных крыс (возраст 3–4 мес., масса 300–400 г). Животные были случайным образом поделены на экспериментальные группы, каждая из которых включала по 5–6 крыс: ложнооперированные (ЛО, как контроль для группы И/Р), контроль с растворителем (для группы с цисплатином), рапамицин, И/Р, рапамицин+И/Р, цисплатин, рапамицин + цисплатин. Животные имели свободный доступ к корму и воде, их содержали в помещениях с постоянной температурой ( $20 \pm 1$  °C) и стандартным 12-часовым световым режимом.

**Протокол И/Р почки и цисплатиновой нефротоксичности.** Для проведения И/Р крыс вводили в общий наркоз с помощью внутривенной инъекции хлоралгидрата (300 мг/кг) и подвергали 40-минутной ишемии левой почки, как описано ранее [18]. Для этого сосудистый пучок левой почки пережимали атравматическим микрососудистым зажимом на 40 мин, затем кровоснабжение восстанавливали путем снятия зажима; прекращение кровотока в течение ишемии и его восстановление при реперфузии оценивали визуально по цвету почки. Перед снятием зажима с левой почки проводили правостороннюю нефрэктомия. В процессе операции температуру тела крыс поддерживали на уровне  $37 \pm 0,5$  °C. Ложнооперированных животных подвергали тем же манипуляциям, что и животных с И/Р, кроме наложения микрососудистого зажима и удаления правой почки.

Часть крыс с И/Р получала инъекцию рапамицина («Temsirrolimus, Abcr GmbH», Германия)

за 1 ч до начала ишемии. Рапамицин растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) до концентрации 1 мг/мл и проводили внутрибрюшинную инъекцию 0,1 мл раствора рапамицина на каждые 100 г массы крысы.

Цисплатиновую нефротоксичность моделировали путем однократной внутрибрюшинной инъекции цисплатина («TevaGuard», Нидерланды) в дозе 15 мг/кг. Рапамицин, растворенный в ДМСО, вводили за 3 ч до и через 24 ч после инъекции цисплатина в дозе 1 мг/кг. Контрольная группа животных получала только ДМСО в те же временные промежутки, что и группа, которой вводили рапамицин.

Образцы крови забирали из сонной артерии крысы через 48 ч после И/Р или инъекции цисплатина и определяли в сыворотке концентрацию мочевины и креатинина с помощью анализатора AU480 Chemistry System («Beckman Coulter», США). Крыс выводили из эксперимента путем декапитации.

Для анализа сигнальных путей, активируемых рапамицином, двум группам крыс делали однократную инъекцию раствора рапамицина в ДМСО в дозе 1 мг/кг за 3 ч или 24 ч до получения образцов почек. Контрольные крысы получали 0,1 мл ДМСО на каждые 100 г массы.

**Вестерн-блоттинг.** Образцы мочи собирали у крыс через 24 ч после И/Р или через 48 ч после инъекции цисплатина, центрифугировали при  $10\,000 \times g$  и смешивали с буфером для образцов. У крыс, которым вводили рапамицин, через 3 ч и 24 ч забирали почки, ткань гомогенизировали при 4 °С в гомогенизаторе тефлон-стекло в фосфатном буфере, содержащем 10 мМ фенилметилсульфонилфторида.

Образцы вносили в 15%-ный полиакриламидный гель (мочу наносили из расчета 20 мкл на дорожку, гомогенаты – 10 мг белка на дорожку), разделяли методом электрофореза по Лэмбли и переносили белки на мембрану из поливинилдендифторида («Sigma-Aldrich», США). Мембраны блокировали 5%-ным раствором обезжиренного молока в фосфатном буфере с добавлением 0,05%-ного Tween-20, а затем инкубировали с первичными антителами: моноклональными кроличьими антителами против NGAL 1 : 1000 («Abcam», Великобритания), моноклональными кроличьими антителами против p70-S6K 1 : 1000 («Cell Signaling», США), моноклональными кроличьими антителами против фосфорилированной формы (по Thr389) p70-S6K 1 : 1000 («Cell Signaling»), моноклональными кроличьими антителами против LC3 A/B 1 : 1000 («Cell Signaling»), моноклональными мышинными антителами против  $\beta$ -актина 1 : 2000 («Sigma-Aldrich»). Далее мембраны инкубировали

со вторичными IgG антителами против антител кролика или мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1 : 7500 («Jackson ImmunoResearch», Великобритания), сигнал детектировали с помощью прибора Chemidoc MP system («BioRad», США). Концентрацию белков в гомогенатах почек определяли с помощью бицинхиновой кислоты («Sigma-Aldrich»). Интенсивность полос на мембранах анализировали с использованием программы ImageJ («NIH», США) [19].

Для мембран, которые в последующем инкубировали с антителами против фосфорилированной (по Thr389) формы p70-S6K, вместо обезжиренного молока использовался блокирующий агент («Amersham», Великобритания). Для этих мембран растворы для блокировки и разведения антител готовили на Tris-буфере (рН 7,6).

**Первичная культура эпителия почечных канальцев.** Почки крыс выделяли в стерильных условиях, корковое вещество почек промывали, измельчали и инкубировали в 0,25%-ном растворе коллагеназы 2 типа («Thermo Fisher Scientific», США) 30 мин при 37 °С. Крупные куски ткани удаляли, суспензию пипетировали, а затем центрифугировали 5 мин при  $100 \times g$  для осаждения канальцев. Осадок канальцев ресуспендировали в полной питательной среде (DMEM/F12 с 10%-ной ФБС («Invitrogen», США) и эпидермальным фактором роста (ЭФР) (10 нг/мл, «Invitrogen»)), сеяли на культуральные флаконы или 96-луночные планшеты в концентрации  $10^5$  клеток/мл и растили при 37 °С в инкубаторе с атмосферой, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Через 48 ч производили смену культуральной среды для удаления неприкрепившихся клеток и дебриса. ЭПК формировали монослой через 4 сут после выделения, поэтому все эксперименты проводили на 2–3 день после выделения.

Для моделирования ишемии *in vitro* ЭПК подвергали кислородно-глюкозной депривации (КГД) в течение 18 ч, для этого полную питательную среду меняли на фосфатно-солевой раствор Дюльбекко (ФСБ-Д) и помещали культуру ЭПК в мультигазовый инкубатор Galaxy 170R («Eppendorf/NewBrunswick», Великобритания) с содержанием кислорода 1%. После КГД снова заменяли ФСБ-Д на описанную выше питательную среду и помещали в инкубатор с нормальным содержанием O<sub>2</sub>. Часть клеток инкубировали с 0,5 мкМ раствором рапамицина в течение 6 ч до КГД, во время КГД или в течение 24 ч после КГД. Часть клеток ЭПК инкубировали с 0,5 мкМ рапамицина 24 ч до МТТ-теста. Для контроля действия ДМСО на клетки к ним

добавляли ДМСО в таком же разведении (1 : 2000), что и в случае добавления рапамицина.

Для анализа цисплатиновой токсичности *in vitro* ЭПК инкубировали 24 ч с разными концентрациями цисплатина (6,25 мкМ, 12,5 мкМ, 25 мкМ), которые разводили в среде DMEM/F12. Эффект рапамицина исследовали в двух экспериментальных протоколах: 1) при предварительном добавлении 0,5 мкМ рапамицина на 3 ч до 24-часовой инкубации с цисплатином, 2) при одновременном добавлении 0,5 мкМ раствора рапамицина и цисплатина во всех перечисленных выше концентрациях на 24 ч.

Выживаемость клеток оценивали широко используемым методом с метилтриазоловым тетразолием (МТТ-тест). Для проведения теста ЭПК культивировали на 96-луночных планшетах, подвергали описанным выше воздействиям, а затем инкубировали с МТТ (5 мг/мл в среде DMEM/F12) в течение 120 мин при 37 °С. Затем раствор красителя удаляли, а образовавшийся в клетках формазан растворяли в 50 мкл ДМСО, абсорбцию измеряли при 540 нм на универсальном планшетном спектрофотометре Zenyth («Anthos Labtec», Австрия).

**Наблюдение за ростом клеток в режиме реального времени.** Анализ кинетики роста клеток выполняли с помощью прибора RTCA iCELLigence™ («ACEA», США). Метод основан на анализе электрического импеданса, измеряемого в специальных лунках, на которые нанесены электроды [20], и может быть использован для исследования пролиферации и гибели ЭПК [21]. Прибор RTCA iCELLigence помещался в инкубатор с атмосферой, содержащей 5%-ную CO<sub>2</sub>, при 37 °С. ЭПК сажали на 8-луночные планшеты со встроенными микроэлектродами. Часть клеток инкубировали с 0,5, 1 или 2 мкМ рапамицина, разведенного в полной культуральной среде (DMEM/F12 с 10%-ной ФБС и 10 нг/мл ЭФР). Через 24 ч ЭПК подвергали КГД, затем возвращали клетки в полную питательную среду и атмосферу с нормальным содержанием O<sub>2</sub>. Скорость роста наблюдали еще в течение 48 ч после окончания КГД.

**Конфокальная микроскопия.** Количество аутофагосом анализировали на инвертированном конфокальном микроскопе LSM510 («Carl Zeiss», Германия). Культуру ЭПК получали, как описано выше; клетки инкубировали 3 ч с 0,5 мкМ рапамицина, 30 мМ хлорохина («Sigma-Aldrich») или в совместном растворе 0,5 мкМ рапамицина и 30 мМ хлорохина. В качестве контроля использовали раствор ДМСО в среде (1: 2000). Рапамицин, хлорохин и ДМСО растворяли в полной питательной среде (DMEM/F12 с 10%-ной ФБС и 10 нг/мл ЭФР). После окончания времени ин-

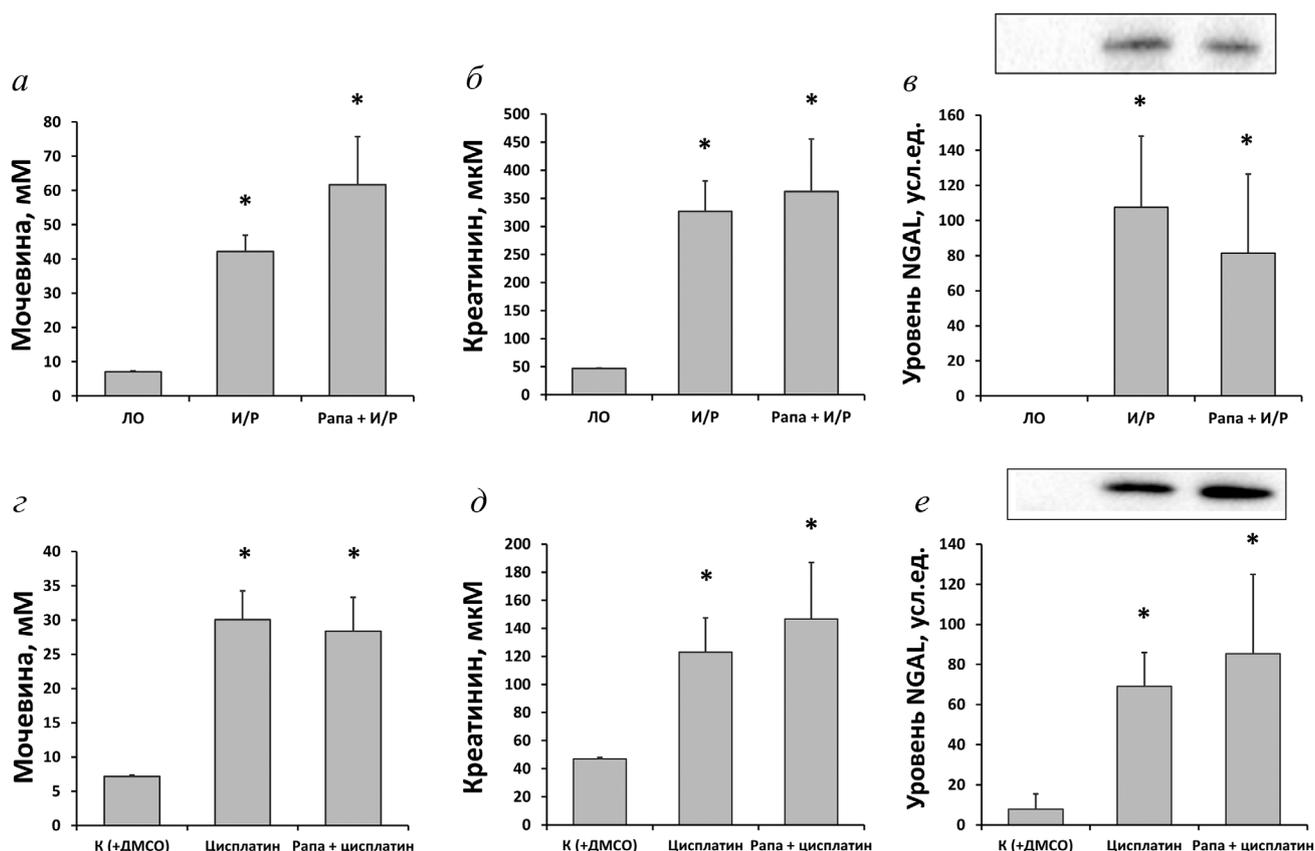
кубации к ЭПК добавляли 2 мкМ зонда на аутофагосомы Cyto-ID («Enzo Life Sciences», США) и анализировали флуоресценцию с помощью конфокального микроскопа LSM 510 (возбуждающий лазер 488 нм, флуоресценция 500–530 нм, пинхол 150 мкм). Среднюю интенсивность флуоресценции Cyto-ID оценивали с помощью программы ImageJ.

**Статистика.** Все значения представлены в виде среднее ± стандартная ошибка среднего. Однородность выборки оценивали с помощью теста Ливиня. Сравнение групп осуществляли с использованием теста Манна–Уитни. Статистический анализ выполняли в библиотеке SciPy для Python и программе Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Действие рапамицина на ОПП, вызванное И/Р или цисплатином.** Была использована И/Р как наиболее изученная модель ОПП; тяжесть почечного повреждения определяли по уровню мочевины и креатинина в сыворотке крови. И/Р приводила к почти 6-кратному повышению концентрации мочевины через 48 ч после начала реперфузии, с  $7,1 \pm 0,2$  мМ до  $42,2 \pm 4,7$  мМ ( $n = 6$ , рис. 1, а). Аналогичное повышение наблюдали и по уровню креатинина, который увеличивался с  $47,0 \pm 1,7$  мкМ до  $326,8 \pm 54,3$  мкМ (рис.1, б). С помощью вестерн-блоттинга был также изучен уровень маркера ОПП (NGAL) в моче и обнаружено, что его содержание многократно возрастает через 24 ч после И/Р (рис. 1, в). Введение рапамицина за 1 ч до И/Р не предотвращало повышение уровней мочевины, креатинина и NGAL ( $n = 5$ , рис. 1, а, б, в), что указывает на отсутствие защитного действия данного вещества.

Для выявления действия рапамицина на цисплатиновую нефротоксичность было исследовано цисплатин-индуцированное ОПП на фоне введения рапамицина или без него. Однократная инъекция цисплатина в дозе 15 мг/кг приводила к выраженному ОПП через 48 ч, о чем можно судить по повышению концентрации мочевины ( $n = 6$ , рис. 1, з) и креатинина (рис. 1, д). При этом уровень маркеров почечной недостаточности в группе крыс с введением рапамицина перед цисплатином был близок к таковому у животных, получавших только цисплатин: ко второму дню после инъекции цисплатина мочевины повышалась до  $30,1 \pm 4,2$  мМ, а на фоне рапамицина – до  $28,3 \pm 5,0$  мМ ( $n = 5$ , рис. 1, з). Аналогичным образом менялся и креатинин: через 2 дня после введения цисплатина его уровень составлял  $123,0 \pm 24,3$  мкМ в группе



**Рис. 1.** Оценка почечной дисфункции и ОПП по маркерам в сыворотке и моче крыс, подвергшихся И/Р или введению цисплатина. (а–б) – Концентрация мочевины и креатинина в сыворотке крыс через 48 ч после И/Р ( $n = 6$ ) или И/Р на фоне 1 мг/кг рапамицина (Рапа + И/Р,  $n = 5$ ). В качестве контроля были использованы ложнооперированные (ЛО) животные; в – уровень NGAL, измеренный с помощью вестерн-блоттинга в образцах мочи крыс через 24 ч после И/Р или И/Р на фоне 1 мг/кг рапамицина; г–д – концентрация мочевины и креатинина в сыворотке крыс через 48 ч после инъекции цисплатина в дозе 15 мг/кг ( $n = 6$ ) или на фоне 1 мг/кг рапамицина (Рапа + цисплатин) за 3 ч до и через 24 ч после введения цисплатина ( $n = 5$ ); е – уровень NGAL, измеренный с помощью вестерн-блоттинга в образцах мочи крыс через 48 ч после инъекции цисплатина или на фоне 1 мг/кг рапамицина за 3 ч до и через 24 ч после введения цисплатина. В группе негативного контроля крысам вводили раствор ДМСО в те же временные интервалы; \*  $p < 0,05$  по сравнению с ЛО и контрольными крысами, которым вводился растворитель

цисплатина и  $146,6 \pm 40,3$  мкМ на фоне рапамицина (рис. 1, д). Повышение уровня NGAL в моче, отражающее почечное повреждение при цисплатин-индуцированном ОПП, коррелировало с функциональными маркерами (рис. 1, е).

**Действие рапамицина на первичную культуру эпителия почечных канальцев.** Для моделирования И/Р *in vitro* на первичной культуре ЭПК применяли протокол КГД с последующей реоксигенацией. Наблюдение за пролиферацией ЭПК в режиме реального времени с использованием прибора iCELLigence выявило, что рапамицин в концентрациях 0,5, 1 и 2 мкМ в некоторой степени снижал скорость пролиферации клеток до КГД (рис. 2, а, б) и значительно замедлял скорость роста клеток в фазу восстановления после КГД (рис. 2, а, в). Похожие результаты были получены с помощью МТТ-теста. Инкубация с 0,5 мкМ рапамицина вела к неболь-

шому уменьшению жизнеспособности клеток по сравнению с контролем. Кроме того, выживаемость клеток, которая уменьшалась после КГД более чем вдвое, снижалась еще больше при инкубации с рапамицином в течение 6 ч до КГД (рис. 2, г). При добавлении рапамицина к культуре ЭПК во время КГД, или сразу после 24 ч реоксигенации, также наблюдали тенденцию к более выраженному падению жизнеспособности клеток по сравнению с культурами, подвергавшимися только КГД (рис. 2, г).

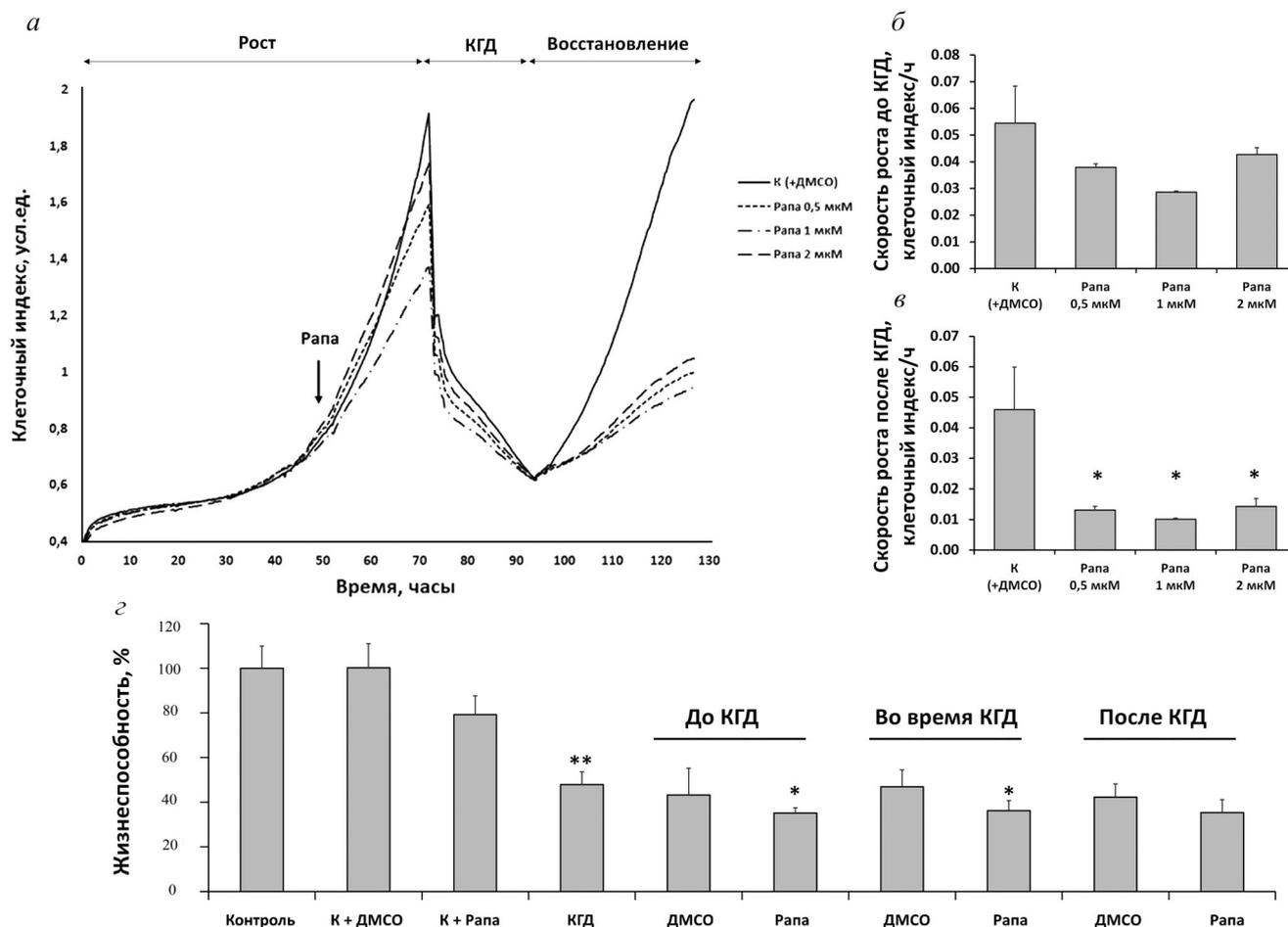
Инкубация ЭПК с цисплатином в течение 24 ч вызывала клеточную гибель дозо-зависимым образом (рис. 3, а, б). Добавление к ЭПК рапамицина одновременно с цисплатином не оказывало значимого влияния на клетки почки (при концентрациях цисплатина 6,25 мкМ и 25 мкМ) или даже ухудшало выживаемость ЭПК (рис. 3, а). Схожие результаты были получены

при добавлении рапамицина до инкубации с цисплатином, в этом случае рапамицин также или не оказывал никакого эффекта на гибель клеток почки, или даже увеличивал ее (рис. 3, б).

Наблюдение за пролиферацией ЭПК в реальном времени с помощью прибора RTCA iCELLigence в процессе инкубации с различными концентрациями цисплатина на фоне рапамицина или без него показало, что цисплатин значительно замедляет скорость роста ЭПК (рис. 3, в, д, е). МТТ-тест подтвердил, что цисплатин приводил к существенной гибели клеток (рис. 3, а, б), при этом в концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ он вызывал практически полную гибель клеток (рис. 3, з). Таким образом, рапамицин в данной модели не только не защищает

клетки от гибели, но при некоторых концентрациях цисплатина даже усугубляет ее (рис. 3, д, е).

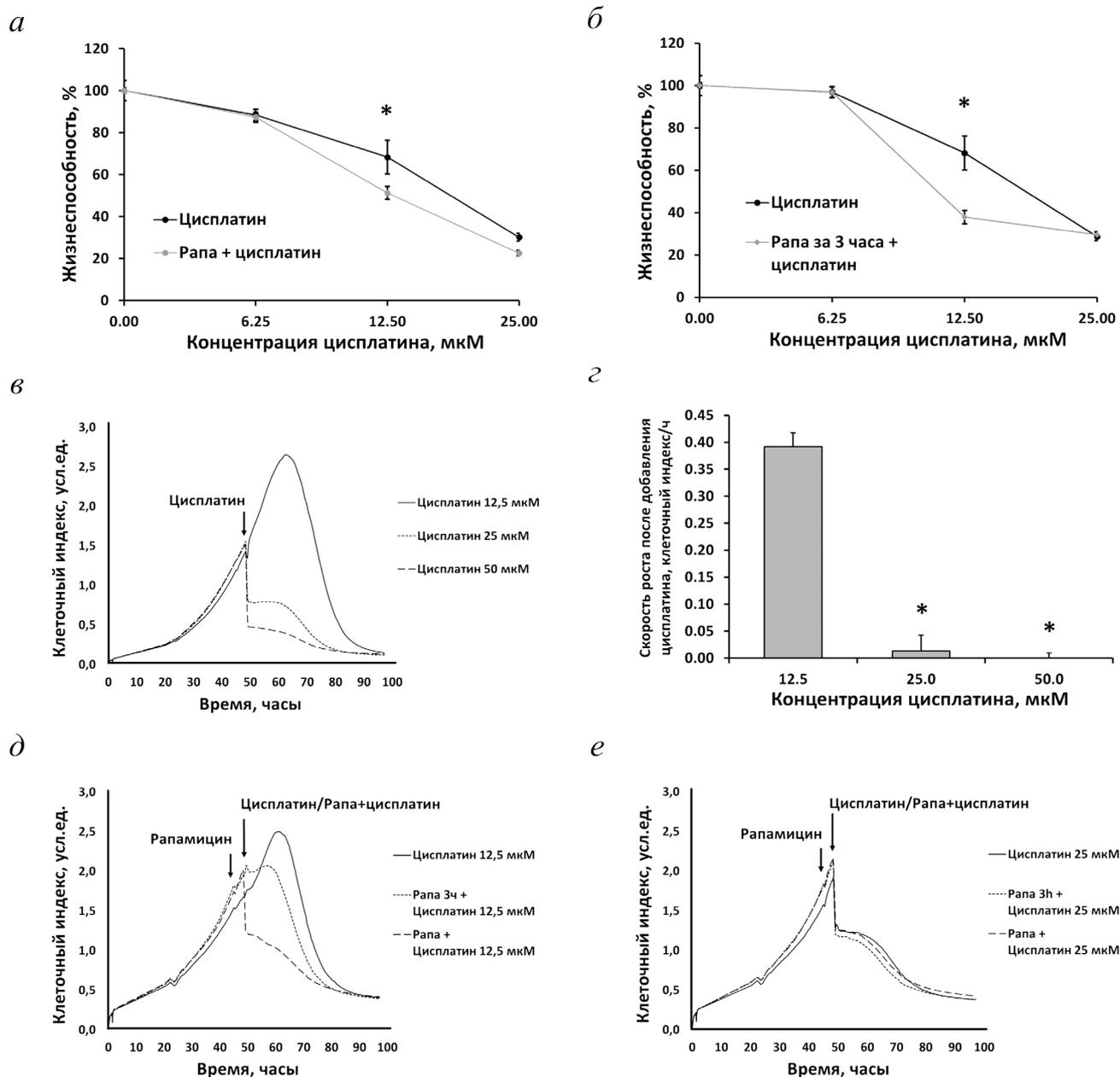
**Ингибирование mTOR и отсутствие активации аутофагии после введения рапамицина.** Для подтверждения действия рапамицина на сигнальные пути mTOR мы проанализировали уровень киназы p70-S6K и ее фосфорилированной формы, которая, как известно, является одной из основных мишеней mTORC1 [22]. Вестерн-блоттинг гомогенатов почек крыс, которым за 3 или 24 ч до забора образцов вводили рапамицин, выявил снижение относительного содержания фосфорилированной формы p70-S6K в группе крыс, получавших инъекцию за 24 ч (рис. 4, а). Таким образом, рапамицин, как и ожидалось, ингибировал активность mTORC1 в



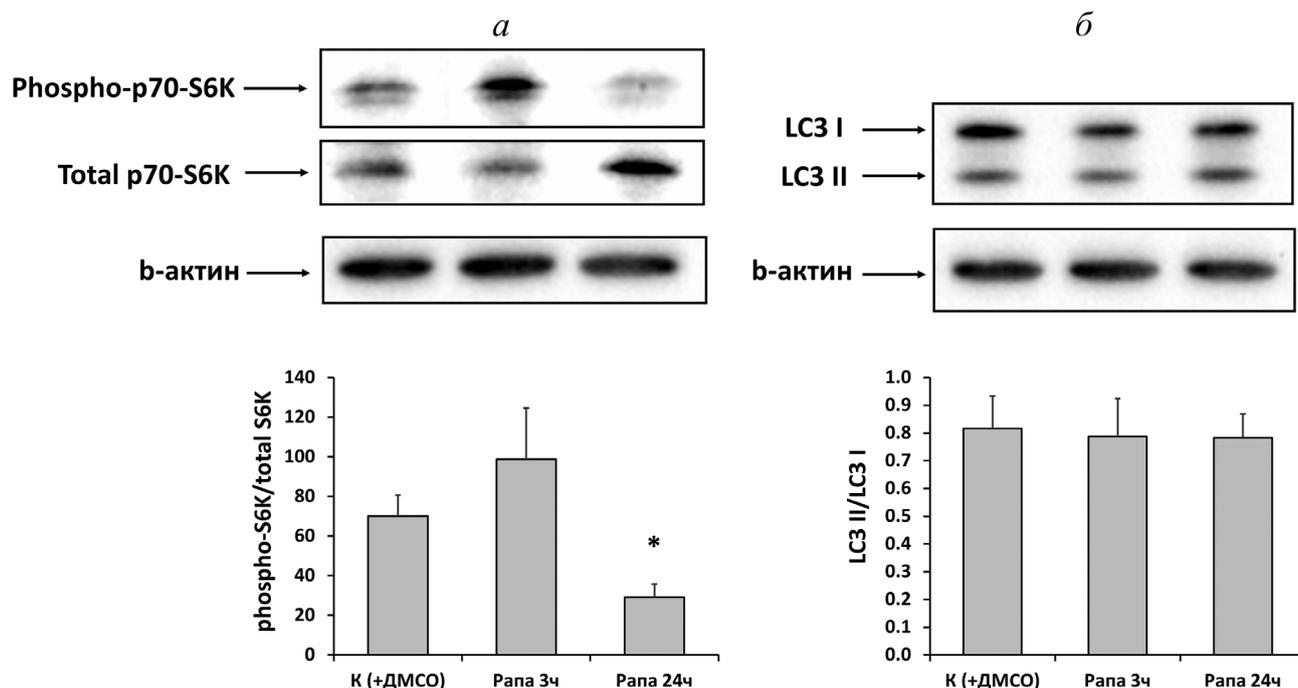
**Рис. 2.** Действие разных доз рапамицина на скорость роста первичной культуры ЭПК при КГД. *а* – Кривая пролиферации ЭПК в реальном времени, полученная с помощью RTCA iCelligence и включающая в себя рост клеток в условиях нормоксии, рост после добавления разных доз рапамицина (0,5, 1 и 2 мкМ), гибель клеток во время КГД и восстановление пролиферации ЭПК после возобновления доступа кислорода и полной питательной среды; *б* – скорость роста ЭПК до начала КГД, но после добавления рапамицина (Рапа); *в* – скорость роста ЭПК в фазу восстановления после КГД; *з* – результаты МТТ-теста при добавлении 0,5 мкМ рапамицина за 6 ч до, во время или после КГД на 24 ч с соответствующими контролями растворителя (ДМСО); \*  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующими контролями с добавлением растворителя (ДМСО); \*\*  $p < 0,05$  по сравнению с контрольными клетками

почечной ткани. Однако соотношение LC3 II/LC3 I оставалось неизменным во всех группах, что говорит об отсутствии активации аутофагии (рис. 4, б).

Недостаточную активацию аутофагии после инкубации с рапамицином также подтвердили с помощью окрашивания первичной культуры ЭПК красителем Cyto-ID, который селективно



**Рис. 3.** Анализ скорости пролиферации первичной культуры ЭПК после инкубации с цисплатином и влияние на нее рапамицина (Рапа). *а* – Выживаемость ЭПК, измеренная с помощью МТТ-теста, после инкубации с разными концентрациями цисплатина и при добавлении рапамицина за 3 ч до цисплатина; *б* – выживаемость ЭПК, измеренная с помощью МТТ-теста, после инкубации с разными концентрациями цисплатина при одновременном добавлении рапамицина; *в* – кривая пролиферации ЭПК в реальном времени, полученная с помощью RTCA iCelligence, включающая в себя рост клеток (при нормальных условиях) и гибель клеток (при инкубации с разными концентрациями цисплатина); *г* – изменение скорости роста ЭПК при инкубации с разными дозами цисплатина; *д* – кинетика пролиферации ЭПК при добавлении только 12,5 мкМ цисплатина, рапамицина за 3 ч до добавления цисплатина или при одновременной инкубации с рапамицином и цисплатином; *е* – изменение кривой пролиферации ЭПК после добавления только 25 мкМ цисплатина, добавления рапамицина за 3 ч до цисплатина или одновременной инкубации с рапамицином и цисплатином; \*  $p < 0,05$  по сравнению с 12,5 мкМ цисплатина



**Рис. 4.** Выявление ингибирования mTORC1 и активации аутофагии в почках крыс через 3 ч или 24 ч после введения рапамицина (Рапа) в дозе 1 мг/кг. *a* – Соотношение фосфорилированной и тотальной формы киназы p70-S6K; *б* – соотношение LC3 II/LC3 I; \*  $p < 0,05$  по сравнению с контрольными крысами, которым вводился только растворитель (ДМСО)

накапливается в аутофагосомах и аутофаголизосомах [23]. Инкубация с рапамицином в течение 3 ч не только не приводила к увеличению интенсивности флуоресценции Cyto-ID в ЭПК по сравнению с контролем, но даже демонстрировала тенденцию к ее уменьшению (рис. 5, *a, д*). Для лучшей визуализации возможного эффекта рапамицина на формирование аутофагосом был использован ингибитор поздних стадий аутофагии (хлорохин), который также добавляли в культуральную среду ЭПК на 3 ч. Добавление хлорохина приводило к значительному усилению интенсивности флуоресценции и увеличению количества Cyto-ID-положительных органелл в ЭПК (рис. 5, *в, д*). Однако совместная инкубация с рапамицином и хлорохином в течение 3 ч не способствовала росту средней интенсивности флуоресценции Cyto-ID по сравнению с хлорохином, подтверждая отсутствие активации аутофагии в ответ на присутствие рапамицина (рис. 5, *г, д*).

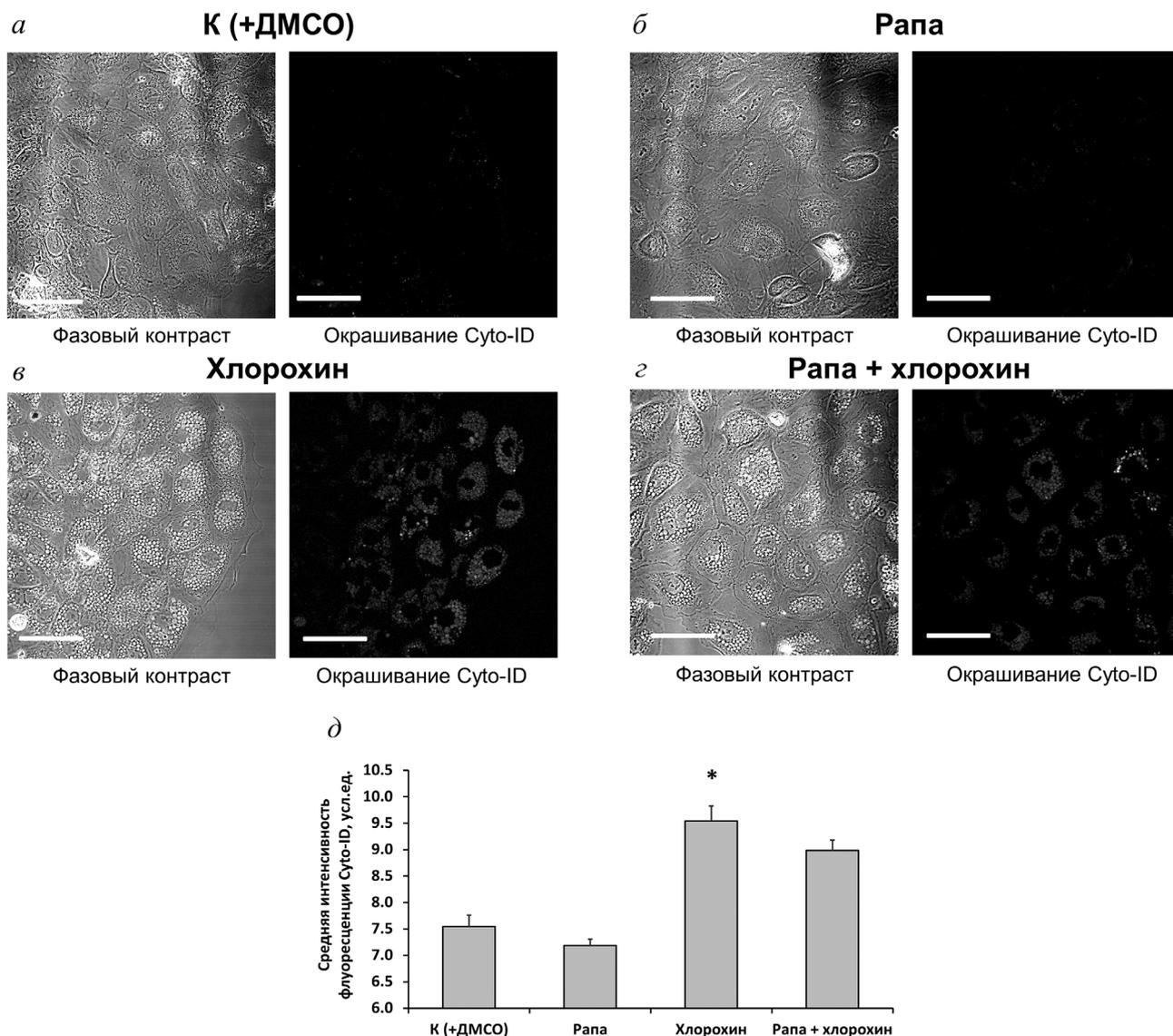
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью данной работы было исследование нефропротекторного потенциала известного индуктора аутофагии, рапамицина, при остром почечном повреждении, индуцированном И/Р или цисплатином. Показано, что рапамицин

был неэффективен во всех исследованных моделях почечного повреждения.

Хотя участие аутофагии в патогенезе острой почечной недостаточности хорошо известно, эффекты активаторов или ингибиторов аутофагии на ОПП остаются неоднозначными. Тем не менее данные большинства работ подтверждают защитную роль аутофагии, поскольку подавление аутофагии в большинстве экспериментов ассоциировалось с увеличением тяжести ОПП. Например, использование ингибитора аутофагии хлорохина увеличивало тяжесть ОПП у животных [10, 14]. В то же время, парадоксальным образом, при использовании значительно меньших доз хлорохина было показано снижение тяжести ОПП после И/Р [24]. Следует отметить, что в этом исследовании параметры аутофагическо-лизосомальной системы не анализировали, поэтому невозможно четко определить механизмы, ответственные за защитное действие хлорохина в этих дозах. Эксперименты, проведенные с другим ингибитором аутофагии 3-метиладенином, который терминирует образование аутофагосома через ингибирование фосфатидилинозитол 3-киназы, также указывали на негативные последствия ингибирования аутофагии [12, 25, 26].

Нам удалось найти только несколько экспериментальных статей, которые прямо исследо-



**Рис. 5.** Формирование аутофагосом в ответ на добавление рапамицина (Рапа) и/или хлорохина. (a–d) – Конфокальные изображения культуры ЭПК после инкубации в течение 3 ч с 0,5 мкМ рапамицина, 30 мМ хлорохина или обоими этими веществами; d – средняя интенсивность флуоресценции Cyto-ID в ЭПК после инкубации с перечисленными выше веществами в течение 3 ч; \*  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующими контролями с добавлением растворителя (ДМСО). Шкала – 50 мкм

вали эффект введения рапамицина на ОПП. Например, внутривенная инъекция рапамицина в дозе 1 мг/кг за 15 мин до И/Р почки улучшала почечную функцию, оцененную по уровням сывороточного креатинина и мочевины через 24 ч после ишемии [25]. Введение рапамицина в этом исследовании также снижало морфологические признаки повреждения ткани почки и уменьшало количество апоптотических клеток [25]. Аналогичные данные были получены после внутрибрюшинной инъекции 1 мг/кг рапамицина за 2 ч до И/Р [27] и в дозе 10 мг/кг через 1 ч после И/Р [26]. Наконец, помимо почек, защит-

ные эффекты рапамицина также наблюдались при И/Р печени [28]. Рапамицин в дозах 1 и 5 мг/кг, вводимый за 1 ч до начала ишемии печени, в значительной степени снижал ее повреждение, что выражалось в понижении уровней АСТ и АЛТ в сыворотке крови и сохранении нормальной морфологии печени [28].

Чтобы иметь возможность соотнести наши результаты с предыдущими исследованиями других авторов, мы использовали рапамицин в таких же дозировках (1 мг/кг) за 1 ч до индукции почечной ишемии, однако не увидели никакого снижения патологически повышенных уровней

креатинина и мочевины в крови (рис. 1, а, б). Более того, был проведен дополнительный анализ биомаркеров ОПП в моче и также не обнаружено снижение уровня NGAL в группе, получавшей рапамицин (рис. 1, в). Отметим, что наши негативные результаты согласуются с ранними исследованиями, опубликованными до того, как появились статьи, описывающие положительные эффекты рапамицина. Поскольку рапамицин и его аналоги исходно позиционировались как иммуносупрессоры, первые исследования рапамицина на почках были направлены на сравнение его с другими известными иммуносупрессорами. Например, сравнение действия 1 мг/кг рапамицина, вводимого за шесть и один час до ишемии, с метилпреднизолоном не выявило никаких различий между группами ни в уровне сывороточного креатинина, ни в гистологической картине почки [29]. В другой работе анализировали эффекты 3 мг/кг рапамицина, вводимого в течение двух дней до ишемии почки и затем через 24 ч или в течение 7 дней. Влияние рапамицина сравнивали с действием иммуносупрессора циклоспорина А и не обнаружили значимых изменений в функции почки, нарушенной после ишемии [30].

Наконец, ряд исследований показывает, что рапамицин, наоборот, может увеличивать тяжесть повреждения после И/Р. Так, введение рапамицина в дозе 3 мг/кг за один день до и в течение дня после И/Р сопровождалось более выраженной почечной дисфункцией через 48 и 120 ч после И/Р по сравнению с нелечеными животными [31]. В этой же работе меньшая доза рапамицина (1,5 мг/кг) не вызывала ни нарушений функций почек, ни каких-либо улучшений. Аналогичные результаты были получены Lui et al.: у мышей, получавших рапамицин (2 мг/кг/сут) перорально, начиная с 24 ч до И/Р почки, через день после И/Р уровни сывороточного креатинина были выше, а гистологическое исследование почек продемонстрировало более выраженное повреждение канальцев [32]. Аналогично Lieberthal et al. показали, что рапамицин ухудшает восстановление после острой почечной недостаточности, вызывая ингибирование пролиферации, остановку клеточного цикла и апоптоз эпителия канальцев [33].

Важно отметить, что рапамицин является сильным иммуносупрессорным агентом, который действует путем ингибирования пролиферации и клональной экспансии стимулированных Т-клеток [34]. Таким образом, его действие *in vivo* является комбинацией активации аутофагии и иммунного ответа, причем последний играет важную роль при ишемии почки и других формах ОПП [35]. Поэтому мы исследовали

влияние рапамицина не только на модели И/Р, но и КГД *in vitro* на первичной культуре ЭПК. Эта экспериментальная система не содержит иммунные клетки, что исключает влияние воспалительной и иммунной компонент на ОПП.

Для оценки сигнализации mTOR мы измерили уровень общего количества и фосфорилированной формы киназы p70-S6K в почках крыс после стандартно используемой дозы рапамицина (1 мг/кг). p70-S6K киназа является одним из главных эффекторов пути mTOR и фосфорилируется активированным mTORC1 [22]. В тех же гомогенатах почек была проанализирована активация пути аутофагии по соотношению LC3 II/LC3 I, а также с помощью специфического флуоресцентного зонда Cyto-ID в клетках, обработанных рапамицином. Хотя наблюдали ингибирование mTORC1 по снижению уровня фосфорилированной киназы p70-S6K через 24 ч после введения рапамицина (рис. 4), не была обнаружена активация аутофагии в обеих моделях *in vivo* и *in vitro* (рис. 4, в, рис. 5). Таким образом, можно сделать вывод, что ингибирование mTOR в наших условиях не приводит к последующей активации аутофагии, и рапамицин не может отменить или уменьшить гибель клеток почки после КГД.

Наблюдаемое снижение скорости пролиферации клеток ЭПК, инкубированных с рапамицином, может объясняться антипролиферативным эффектом рапамицина, которое было впервые описано для Т-клеток и опухолевых клеток [36, 37]. Снижение скорости пролиферации, вызванное этим препаратом, уже было показано ранее для культуры проксимальных эпителиальных клеток и приводило к снижению числа делящихся почечных клеток [33]. Об этом же говорит то, что срезы почек мышей, получивших рапамицин, демонстрировали значительно меньшее число PCNA-позитивных клеток после ишемии/реперфузии [32].

Мы также проанализировали эффект рапамицина на еще одной модели ОПП, цисплатин-индуцированной нефротоксичности. Так как патогенетические механизмы цисплатин-индуцированного повреждения клеток почки могут отличаться от механизмов, запускаемых ишемией с последующей реперфузией, действие рапамицина в этой модели может быть совсем другим. Ранее неоднократно было показано, что при цисплатин-индуцированном ОПП происходит активация аутофагии как *in vitro*, так и *in vivo* [5, 6]. Более того, ингибирование аутофагии хлорохином усиливало ОПП, тогда как стимуляция аутофагии сохраняла функцию и гистологию почки, что подтверждает защитную роль аутофагии при цисплатин-индуцированном ОПП [38].

Однако не был обнаружен защитный эффект введения рапамицина *in vivo* в экспериментах по цисплатин-индуцированной нефротоксичности у крыс или в модели *in vitro* на клетках почечных канальцев (рис. 1, *z-e*, рис. 3). Отметим, что наши данные согласуются с исследованием Nakagawa et al., показавших, что уровни сывороточного креатинина и маркера ОПП КИМ-1 были выше у крыс при совместном введении аналога рапамицина, эверолимуса и цисплатина. Авторы сделали вывод, что ингибирование mTOR эверолимусом снижает почечную функцию [39]. Хотя цисплатин в этом исследовании вызывал активацию mTOR, а введение эверолимуса ингибировало эту активацию, никакого защитного эффекта эверолимуса на почку не было обнаружено.

Таким образом, имеющиеся в настоящее время результаты исследований аутофагии и ее активации при ОПП можно разделить на две группы. С одной стороны, большое число работ четко доказывают важную роль аутофагии в патогенезе ОПП, при этом активация аутофагии (например, при ограничении калорийности питания) обеспечивает защиту почки от различных форм ОПП [15, 40, 41]. С другой стороны, попытки влияния на аутофагию с помощью фармакологических препаратов, в частности, рапамицина и его аналогов, часто оказываются не способными обеспечить выраженную нефропротекцию. Более того, в ряде случаев наблюдается даже усиление повреждения почки при использовании рапамицина. В этой связи нам кажется важным обратить внимание исследователей на то, что рапамицин не является идеальным миметиком ограничения калорийности питания, как это зачастую считается, поскольку ограничение питания действует на mTOR через различные сигнальные пути, например, через механизмы фосфорилирования/дефосфорилирования АМПК и Akt [42]. Рапамицин же действует как аллостерический ингибитор mTOR [43] за счет формирования комплекса с FK506-связывающим белком, и этот комплекс, в свою очередь, связывается с mTOR и блокирует его. Вероятно, ограничение калорийности питания имеет ряд других мишеней в клетке по сравнению с рапамицином, действующим только как ингибитор mTORC1, поэтому нельзя ставить знак равенства в действии рапамицина и ограничения питания [44, 45].

Обращает на себя внимание тот факт, что большинство работ, демонстрирующих защитные эффекты рапамицина при ОПП, опубликованы после 2010 г., когда набрали популярность взгляды на аутофагию и ее активаторы как на процесс, играющий исключительно положительную роль в продлении жизни и здоровом долголетии. В то же время исследования, описывающие отрицательные эффекты рапамицина или отсутствие каких-либо эффектов на ОПП, относятся к более раннему периоду, когда рапамицин рассматривался еще исключительно как иммуносупрессор.

На основании наших исследований и анализа аналогичных работ следует обратить внимание, что существует необходимость очень тщательного анализа эффектов фармакологических воздействий, призванных имитировать физиологические походы, активирующие аутофагию. Не всегда вещества, ингибирующие mTOR, будут абсолютно идентичны в своем действии естественным физиологическим процессам, например, ограничению калорийности питания. Эффекты рапамицина на ишемическое и цисплатин-индуцированное ОПП остаются противоречивыми, и на данный момент нельзя однозначно делать вывод о его нефропротекторных свойствах. Возможно, это одна из причин, по которой пока не известно об успешных попытках применения рапамицина в клинической практике.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 18-15-00058).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая работа не содержит каких-либо исследований, в которых в качестве объектов были использованы люди. Работу с лабораторными животными проводили в соответствии с требованиями Комиссии по биоэтике НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского. Все манипуляции выполняли в соответствии с руководством Федерации европейских научных ассоциаций по лабораторным животным.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Levine, B., and Kroemer, G. (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease, *Cell*, **132**, 27–42, doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018.
2. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion, *Nature*, **451**, 1069–1075, doi: 10.1038/nature06639.
3. Ryu, D., Mouchiroud, L., Andreux, P.A., Katsyuba, E., Moullan, N., and Nicolet-Dit-Félix, A.A., et al. (2016) Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in

- C. elegans* and increases muscle function in rodents, *Nat. Med.*, **22**, 879–888, doi: 10.1038/nm.4132.
4. Andreux, P.A., Blanco-Bose, W., Ryu, D., Burdet, F., Ibberson, M., and Aebischer, P., et al. (2019) The mitophagy activator urolithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans, *Nat. Metab.*, **1**, 595–603, doi: 10.1038/s42255-019-0073-4.
  5. Periyasamy-Thandavan, S., Jiang, M., Wei, Q., Smith, R., Yin, X.-M., and Dong, Z. (2008) Autophagy is cytoprotective during cisplatin injury of renal proximal tubular cells, *Kidney Int.*, **74**, 631–640, doi: 10.1038/ki.2008.214.
  6. Takahashi, A., Kimura, T., Takabatake, Y., Namba, T., Kaimori, J., and Kitamura, H., et al. (2012) Autophagy guards against cisplatin-induced acute kidney injury, *Am. J. Pathol.*, **180**, 517–525, doi: 10.1016/j.ajpath.2011.11.001.
  7. Liu, S., Hartleben, B., Kretz, O., Wiech, T., Igarashi, P., and Mizushima, N., et al. (2012) Autophagy plays a critical role in kidney tubule maintenance, aging and ischemia-reperfusion injury, *Autophagy*, **8**, 826–837, doi: 10.4161/auto.19419.
  8. Li, L., Wang, Z. V., Hill, J.A., and Lin, F. (2014) New autophagy reporter mice reveal dynamics of proximal tubular autophagy, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **25**, 305–315, doi: 10.1681/ASN.2013040374.
  9. Li, T., Liu, Y., Zhao, J., Miao, S., Xu, Y., and Liu, K., et al. (2017) Aggravation of acute kidney injury by mPGES-2 down regulation is associated with autophagy inhibition and enhanced apoptosis, *Sci. Rep.*, **7**, 10247, doi: 10.1038/s41598-017-10271-8.
  10. Mei, S., Livingston, M., Hao, J., Li, L., Mei, C., and Dong, Z. (2016) Autophagy is activated to protect against endotoxic acute kidney injury, *Sci. Rep.*, **6**, 22171, doi: 10.1038/srep22171.
  11. Karagiannidis, I., Katakis, A., Glustianou, G., Memos, N., Papalois, A., and Alexakis, N., et al. (2016) Extended cytoprotective effect of autophagy in the late stages of sepsis and fluctuations in signal transduction pathways in a rat experimental model of kidney injury, *Shock*, **45**, 139–147, doi: 10.1097/SHK.0000000000000505.
  12. Ko, G.J., Bae, S.Y., Hong, Y.-A., Pyo, H.J., and Kwon, Y.J. (2016) Radiocontrast-induced nephropathy is attenuated by autophagy through regulation of apoptosis and inflammation, *Hum. Exp. Toxicol.*, **35**, 724–736, doi: 10.1177/0960327115604198.
  13. Kimura, T., Takabatake, Y., Takahashi, A., Kaimori, J., Matsui, I., and Namba, T., et al. (2011) Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **22**, 902–913, doi: 10.1681/ASN.2010070705.
  14. Jiang, M., Wei, Q., Dong, G., Komatsu, M., Su, Y., and Dong, Z. (2012) Autophagy in proximal tubules protects against acute kidney injury, *Kidney Int.*, **82**, 1271–1283, doi: 10.1038/ki.2012.261.
  15. Andrianova, N.V., Jankauskas, S.S., Zorova, L.D., Pevzner, I.B., Popkov, V.A., and Silachev, D.N., et al. (2018) Mechanisms of age-dependent loss of dietary restriction protective effects in acute kidney injury, *Cells*, **7**, 178, doi: 10.3390/cells7100178.
  16. Kuo, S.-Y., Castoreno, A.B., Aldrich, L.N., Lassen, K.G., Goel, G., and Dančik, V., et al. (2015) Small-molecule enhancers of autophagy modulate cellular disease phenotypes suggested by human genetics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 4281–4287, doi: 10.1073/pnas.1512289112.
  17. Blagosklonny, M.V. (2017) From rapalogs to anti-aging formula, *Oncotarget*, **8**, 35492–35507, doi: 10.18632/oncotarget.18033.
  18. Plotnikov, E.Y., Kazachenko, A.V., Vyssokikh, M.Y., Vasileva, A.K., Tcvirkun, D.V., and Isaev, N.K., et al. (2007) The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney, *Kidney Int.*, **72**, 1493–1502, doi: 10.1038/sj.ki.5002568.
  19. Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012) NIH image to imageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods*, **9**, 671–675.
  20. Giaever, I., and Keese, C.R. (1984) Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3761–3764.
  21. Popkov, V.A., Andrianova, N.V., Manskikh, V.N., Silachev, D.N., Pevzner, I.B., and Zorova, L.D., et al. (2018) Pregnancy protects the kidney from acute ischemic injury, *Sci. Rep.*, **8**, 14534, doi: 10.1038/s41598-018-32801-8.
  22. Tavares, M.R., Pavan, C.B., Amaral, C.L., Meneguello, L., Luchessi, A.D., and Simabuco, F.M. (2015) The S6K protein family in health and disease, *Life Sci.*, **131**, 1–10, doi: 10.1016/j.lfs.2015.03.001.
  23. Stankov, M., Panayotova-Dimitrova, D., Leverkus, M., Klusmann, J.-H., and Behrens, G. (2014) Cytometric analysis of autophagic activity with cyto-ID staining in primary cells, *Bio-Protoc.*, **4**, doi: 10.21769/BioProtoc.1090.
  24. Todorovic, Z., Medic, B., Basta-Jovanovic, G., Radojevic Skodric, S., Stojanovic, R., and Rovcanin, B., et al. (2014) Acute pretreatment with chloroquine attenuates renal I/R injury in rats, *PLoS One*, **9**, 92673, doi: 10.1371/journal.pone.0092673.
  25. Zhang, Y.-L., Zhang, J., Cui, L.-Y., and Yang, S. (2015) Autophagy activation attenuates renal ischemia-reperfusion injury in rats, *Exp. Biol. Med.*, **240**, 1590–1598, doi: 10.1177/1535370215581306.
  26. Ling, H., Chen, H., Wei, M., Meng, X., Yu, Y., and Xie, K. (2016) The effect of autophagy on inflammation cytokines in renal ischemia/reperfusion injury, *Inflammation*, **39**, 347–356, doi: 10.1007/s10753-015-0255-5.
  27. Guan, X., Qian, Y., Shen, Y., Zhang, L., Du, Y., and Dai, H., et al. (2015) Autophagy protects renal tubular cells against ischemia/reperfusion injury in a time-dependent manner, *Cell. Physiol. Biochem.*, **36**, 285–298, doi: 10.1159/000374071.
  28. Zhu, J., Lu, T., Yue, S., Shen, X., Gao, F., and Busuttill, R.W., et al. (2015) Rapamycin protection of livers from ischemia and reperfusion injury is dependent on both autophagy induction and mammalian target of rapamycin complex 2-Akt activation, *Transplantation*, **99**, 48–55, doi: 10.1097/TP.0000000000000476.
  29. Parra, C., Salas, P., and Dominguez, J. (2010) Effects of immunosuppressive drugs on rat renal ischemia reperfusion injury, *Transplant. Proc.*, **42**, 245–247, doi: 10.1016/j.transproceed.2009.11.018.
  30. Pereira, B.J., Castro, I., Burdman, E.A., Malheiros, D.M., and Yu, L. (2010) Effects of sirolimus alone or in combination with cyclosporine A on renal ischemia/reperfusion injury, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **43**, 737–744.
  31. Gonçalves, G.M., Cenedeze, M.A., Feitoza, C.Q., de Paula, C.B., Marques, G.D., and Pinheiro, H.S., et al. (2007) The role of immunosuppressive drugs in aggravating renal ischemia and reperfusion injury, *Transplant. Proc.*, **39**, 417–420, doi: 10.1016/j.transproceed.2007.01.027.
  32. Lui, S.L., Chan, K.W., Tsang, R., Yung, S., Lai, K.N., and Chan, T.M. (2006) Effect of rapamycin on renal ischemia-reperfusion injury in mice, *Transpl. Int.*, **19**, 834–839, doi: 10.1111/j.1432-2277.2006.00361.x.
  33. Lieberthal, W., Fuhro, R., Andry, C.C., Rennke, H., Abernathy, V.E., and Koh, J.S., et al. (2001) Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **281**, 693–706, doi: 10.1152/ajprenal.2001.281.4.F693.
  34. Martel, R.R., Klicius, J., and Galet, S. (1977) Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **55**, 48–51.

35. Kim, B.S., Lim, S.W., Li, C., Kim, J.S., Sun, B.K., and Ahn, K.O., et al. (2005) Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys, *Transplantation*, **79**, 1370–1377.
36. Dumont, F.J., and Su, Q. (1996) Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin, *Life Sci.*, **58**, 373–395.
37. Law, B.K. (2005) Rapamycin: an anti-cancer immunosuppressant? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **56**, 47–60, doi: 10.1016/j.critrevonc.2004.09.009.
38. Kaushal, G.P. (2012) Autophagy protects proximal tubular cells from injury and apoptosis, *Kidney Int.*, **82**, 1250–1253, doi: 10.1038/ki.2012.337.
39. Nakagawa, S., Nishihara, K., Inui, K., and Masuda, S. (2012) Involvement of autophagy in the pharmacological effects of the mTOR inhibitor everolimus in acute kidney injury, *Eur. J. Pharmacol.*, **696**, 43–54, doi: 10.1016/j.ejphar.2012.09.010.
40. Mitchell, J.R., Verweij, M., Brand, K., van de Ven, M., Goemaere, N., and van den Engel, S., et al. (2010) Short-term dietary restriction and fasting precondition against ischemia reperfusion injury in mice, *Aging Cell*, **9**, 40–53, doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00532.x.
41. Ning, Y.-C., Cai, G.-Y., Zhuo, L., Gao, J.-J., Dong, D., and Cui, S.-Y., et al. (2013) Beneficial effects of short-term calorie restriction against cisplatin-induced acute renal injury in aged rats, *Nephron. Exp. Nephrol.*, **124**, 19–27, doi: 10.1159/000357380.
42. Tokunaga, C., Yoshino, K., and Yoneezawa, K. (2004) mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **313**, 443–446.
43. Li, J., Kim, S.G., and Blenis, J. (2014) Rapamycin: one drug, many effects, *Cell Metab.*, **19**, 373–379, doi: 10.1016/j.cmet.2014.01.001.
44. Lee, S.-H., and Min, K.-J. (2013) Caloric restriction and its mimetics, *BMB Rep.*, **46**, 181–187.
45. Lamming, D.W. (2016) Inhibition of the mechanistic target of rapamycin (mTOR)—rapamycin and beyond, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **6**, a025924, doi: 10.1101/cshperspect.a025924.

## RAPAMYCIN DOES NOT PROTECT AGAINST ISCHEMIC AND CISPLATIN-INDUCED KIDNEY INJURY

N. V. Andrianova<sup>1,2</sup>, L. D. Zorova<sup>2,3</sup>, V. A. Babenko<sup>2,3</sup>, I. B. Pevzner<sup>2,3</sup>,  
V. A. Popkov<sup>2,3</sup>, D. N. Silachev<sup>2,3</sup>, E. Y. Plotnikov<sup>2,3,4\*</sup>, and D. B. Zorov<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119992 Moscow, Russia

<sup>2</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia;  
E-mail: plotnikov@belozersky.msu.ru, zorov@belozersky.msu.ru

<sup>3</sup> Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, 117997 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Sechenov First Moscow State Medical University, Institute of Molecular Medicine, 119991 Moscow, Russia

Received June 24, 2019

Revised July 12, 2019

Accepted July 12, 2019

Autophagy plays an important role in the pathogenesis of acute kidney injury (AKI). Although autophagy activation was shown to be associated with an increased lifespan and beneficial effects in various pathologies, the impact of autophagy activators, particularly, rapamycin and its analogues, on AKI remains obscure. In our study, we explored the effects of rapamycin treatment in *in vivo* and *in vitro* models of ischemic and cisplatin-induced AKI. The impact of rapamycin on the kidney function after renal ischemia/reperfusion (I/R) or exposure to the nephrotoxic agent cisplatin was assessed by quantifying blood urea nitrogen and serum creatinine and evaluating the content of neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a novel biomarker of AKI. *In vitro* experiments were performed on the primary culture of renal tubular cells (RTCs) that were subjected to oxygen-glucose deprivation (OGD) or incubated with cisplatin under various rapamycin treatment protocols. Cell viability and proliferation were estimated by the MTT assay and real-time cell analysis using an RTCA iCELLigence system. Although rapamycin inhibited mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling, it failed to enhance the autophagy and to ameliorate the severity of AKI caused by ischemia or cisplatin-induced nephrotoxicity. Experiments with RTCs demonstrated that rapamycin exhibited the anti-proliferative effect in primary RTC cultures but did not protect renal cells exposed to OGD or cisplatin. Our study revealed for the first time that the mTOR inhibitor rapamycin did not prevent AKI caused by renal I/R or cisplatin-induced nephrotoxicity and, therefore, cannot be considered as an ideal mimetic of the autophagy-associated nephroprotective mechanisms (e.g., those induced by caloric restriction), as it had been suggested earlier. The protective action of such approaches like caloric restriction might not be limited to mTOR inhibition and can proceed through more complex mechanisms involving alternative autophagy-related targets. Thus, the use of rapamycin and its analogues for the treatment of various AKI forms requires further studies in order to understand potential protective or adverse effects of these compounds in different contexts.

**Keywords:** rapamycin, acute kidney injury, ischemia, cisplatin, renal tubular cells, autophagy, nephroprotection