

На правах рукописи

НИКОЛАЕВА
Светлана Дмитриевна

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПРОДУКЦИИ
ОКСИДА АЗОТА В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ МОЧЕВОГО
ПУЗЫРЯ ЛЯГУШКИ**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2011

Работа выполнена в лаборатории физиологии почки и водно-солевого обмена Учреждения Российской академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук
Парнова Римма Германовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Крутецкая Зоя Иринарховна

доктор биологических наук
Шпаков Александр Олегович

Ведущее научное учреждение: Учреждение Российской академии
медицинских наук Научно-
исследовательский институт
экспериментальной медицины Северо-
Западного отделения РАМН

Защита диссертации состоится «11» октября 2011 года в 11 часов на заседании диссертационного совета (Д 002.127.01) при Учреждении Российской академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН по адресу: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (194223, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44).

Автореферат разослан «___» сентября 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

М.Н. Маслова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Оксид азота (NO) является важнейшим ауто/паракринным регулятором огромного спектра физиологических реакций. Низкомолекулярное неполярное соединение NO способно быстро диффундировать и свободно проникать через плотные клеточные слои и межклеточное пространство, не требуя специальных переносчиков. Внутриклеточные эффекты NO включают в себя (А) его связывание с гем-содержащими белками, из которых наиболее важное значение во внутриклеточной сигнализации имеет цитозольная гуанилатциклаза, (Б) нитрозилирование различных белков, что приводит к изменению их функциональной активности, (В) образование активных форм кислорода и азота [см. обзоры Stamler, 1994; MacMicking, 1997; Liu & Huang, 2008] и др. Эндогенный NO образуется в организме при ферментативном окислении аминокислоты *L*-аргинина. Эта реакция катализируется ферментом NO-синтазой (NOS), для которой известны три изоформы: нейрональная (nNOS, NOS1), первоначально обнаруженная в нейронах центральной и периферической нервной системы; эндотелиальная (eNOS, NOS3), впервые идентифицированная в клетках эндотелия кровеносных сосудов; и индуцибельная (iNOS, NOS2), которая, в отличие от nNOS и eNOS, как правило, не экспрессируется постоянно, а индуцируется в клетках различных типов в ответ на действие патологических стимулов. Изоформы NOS различаются аминокислотной последовательностью, молекулярной массой, локализацией в органах и тканях и механизмами, регулируемыми их экспрессию и активность.

Образующийся при участии NOS оксид азота обладает крайне разнообразным биологическим действием, играя важную роль в различных физиологических процессах, таких как поддержание тонуса сосудов, воспалительный и иммунный ответ, нейротрансмиссия, модуляция ионных каналов, агрегация тромбоцитов, секреция ренина, ангиогенез и др. [см. обзоры Bredt, 1994; Reid, 1995; MacMicking, 1997; Ziche 2000; Garthwaite, 2008; Kolluru, 2010]. Конститутивные NOS обеспечивают участие NO в процессах внутриклеточной сигнализации, опосредованных, главным образом, активацией цитозольной гуанилатциклазы и увеличением уровня цГМФ. Функция iNOS преимущественно связана с участием образовавшегося NO в воспалительных реакциях и обеспечении неспецифической иммунной защиты [Dai et al., 1995; Calza et al., 1997]. Токсическое действие NO на бактериальные патогены основано на его взаимодействии с активными формами кислорода, нитрозилировании различных реакционно-способных групп и других механизмах, что приводит к повреждениям белков, ДНК и липидов бактериальной клетки [Fang, 1997]. Наиболее эффективными индукторами iNOS, стимулирующими транскрипцию гена, являются цитокины (интерлейкин-1, фактор некроза опухолей, γ -интерферон), а также бактериальные липополисахариды (ЛПС) – компоненты клеточной стенки грамотрицательных бактерий [Ziesche et al., 1996; Galea, Feinstein, 1999; Kleinert et al., 2003].

Большой объем существующей информации свидетельствует о наличии огромного разнообразия механизмов регуляции образования NO. К ним

относится регуляция уровня экспрессии NO-синтезирующих ферментов, их различные посттрансляционные модификации, Ca^{2+} /кальмодулин-зависимое изменение активности NOS, наличие кофакторов, доступность субстрата, регулируемая как на уровне поступления аргинина в клетку, так и изменением активности ферментов, конкурирующей с NOS за общий субстрат [Kone, 2000; Closs et al, 2000; Mori, Gotoh, 2000; Li, Poulos, 2005]. Наиболее полно регуляция образования NO и механизмы его физиологического действия исследованы в клетках нейронов и глии [Espluques, 2002; Saha, Pahan, 2006], эндотелии сосудов [Fleming, Busse, 1999; Sessa, 2005] и в различных типах макрофагов [Mori, Gotoh, 2004; Kobayashi, 2010]. Эпителиальная ткань представляет большой интерес в отношении регуляции продукции NO и его физиологической роли, так как эпителии являются первым барьером на пути проникновения бактериальных патогенов и помимо этого выполняют присущие каждому типу данной ткани специализированные функции. Тем не менее, данные по эпителиальной ткани в отношении способов регуляции образования NO и разнообразию экспрессируемых изоформ NOS немногочисленны.

Данная работа посвящена исследованию регуляции продукции NO в клетках осморегулирующего эпителия, специализированного на поддержании водно-электролитного баланса. В качестве экспериментальной модели были выбраны изолированные эпителиальные клетки мочевого пузыря лягушки – классического объекта, используемого в изучении механизмов гормональной регуляции транспорта воды. В основе интереса к этому объекту лежит функциональное сходство и общность молекулярных механизмов, обеспечивающих действие антидиуретического гормона (АДГ) на реабсорбцию воды в эпителии мочевого пузыря бесхвостых амфибий и собирательных трубок почки млекопитающих [Наточин, 1983; Hasegawa et al., 2005; Uchiyama, Konno, 2005]. Имеющиеся данные свидетельствуют о несомненной роли NO в механизмах регуляции водного транспорта. Так, на перфузируемых фрагментах собирательных трубок почки крысы и изолированном мочевом пузыре лягушки было показано, что доноры NO вызывают снижение действия АДГ на увеличение осмотической проницаемости [Garcia et al., 1996; Fock et al., 2004; Klokke et al., 2009]. Есть данные, что ингибирующее действие простагландина E_2 на АДГ-стимулированную осмотическую проницаемость обусловлено EP1-рецептор-опосредованной мобилизацией Ca^{2+} , которая приводит к увеличению продукции NO [Bachteeva et al., 2007].

Важной предпосылкой проведения данной работы является тот факт, что мочевой пузырь амфибий может быть колонизирован грамотрицательной бактериальной флорой, главным образом, представителями семейства *Enterobacteriaceae* [Hutchinson, Porter, 1972], эндогенное присутствие которых рассматривается как одна из причин низкого эффекта АДГ на увеличение осмотической проницаемости [Лаврова и др., 2011]. Совокупность этих данных позволяет предполагать наличие в эпителии мочевого пузыря лягушки как конститутивных NOS, участвующих в осморегуляции, так и iNOS, обеспечивающей неспецифическую иммунную защиту.

Целью исследования было изучение молекулярных механизмов, участвующих в регуляции продукции NO в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки *Rana temporaria*. В данном исследовании рассматривались два аспекта регуляции синтеза NO изучаемыми клетками: (1) регуляция экспрессии фермента и (2) регуляция NO-синтазной активности за счет доступности субстрата. Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Идентифицировать изоформы NOS, экспрессируемые эпителиальными клетками мочевого пузыря лягушки.

2. Оценить влияние ЛПС *E. coli* на экспрессию iNOS и продукцию NO изучаемыми клетками. Исследовать возможность экспрессии TLR4, рецепторов ЛПС, в эпителиальных клетках.

3. Исследовать роль циклооксигеназы и продуктов ее каталитической активности в регуляции экспрессии NOS и продукции NO.

4. Охарактеризовать кинетические параметры транспорта L-аргинина и изучить влияние ЛПС на активность транспортера.

5. Оценить активность аргиназы, использующей аргинин в качестве субстрата катализируемых ею реакций, и выявить экспрессию отдельных изоформ фермента в изучаемых клетках. Исследовать участие аргиназы в регуляции активности NO-синтазы.

Научная новизна. Впервые была выявлена NO-синтазная активность в клетках эпителия мочевого пузыря лягушки и показана экспрессия нейрональной и индуцибельной NOS в изучаемых клетках. Впервые определена и проанализирована нуклеотидная и аминокислотная последовательности участка iNOS у данного вида. Впервые была показана способность клеток эпителия мочевого пузыря лягушки экспрессировать TLR4, рецептор бактериального ЛПС, и отвечать на ЛПС рецептор-опосредованным усилением экспрессии мРНК, белка iNOS и увеличением продукции NO. Доказано, что экспрессия iNOS в данных клетках критично зависит от активности циклооксигеназы.

Впервые на клетках осморегулирующего эпителия охарактеризованы особенности входа L-аргинина, его кинетические характеристики, установлена зависимость входа аргинина от натрия, что позволило отнести его к транспортерам катионных аминокислот системы y^+ . Для данного типа клеток было впервые показано, что вход аргинина в клетку стимулируется ЛПС и зависит от уровня активности индуцибельной NOS.

Впервые показано, что клетки осморегулирующего эпителия обладают относительно высокой аргиназной активностью, которая обеспечивается экспрессией аргиназы II. Для данного типа ткани были впервые продемонстрированы конкурентные отношения двух ферментов – NOS и аргиназы.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Эпителиальные клетки мочевого пузыря лягушки экспрессируют нейрональную и индуцибельную NOS.

2. Эпителиальные клетки отвечают на бактериальный ЛПС TLR4-опосредованным усилением экспрессии iNOS и продукции NO. Экспрессия iNOS критично зависит от активности циклооксигеназы и продукции ПГЕ₂.

3. Дополнительная регуляция синтеза NO в эпителиальных клетках осуществляется на уровне модуляции доступности субстрата NOS – L-аргинина, а именно посредством изменения активности транспорта аргинина в клетку и конкуренции аргиназы и NOS за общий субстрат.

Теоретическая и практическая значимость. Исследование имеет фундаментальное значение для понимания механизмов регуляции биосинтеза NO в эпителиальных тканях, механизмов развития неспецифического иммунного ответа и роли NO в поддержании водно-солевого баланса, что имеет большое значение для разработки новых фармакологических препаратов для лечения заболеваний выделительной, сердечно-сосудистой и других систем организма человека и животных, а также для разработки методических подходов в диагностике этих заболеваний. Работа представляет также большой интерес для эволюционной и сравнительной физиологии. Полученные результаты могут быть включены в курсы лекций по физиологии и биохимии для студентов биолого-почвенного и медицинского факультетов Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербургского медицинского университета и других вузов.

Апробация работы. Результаты исследования доложены и обсуждены на Всероссийской межвузовской научно-технической конференции студентов и аспирантов (Санкт-Петербург, 2005), на 10-й Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2006), на XIII Международном совещании и VI Школе по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2006), на VI Сибирском физиологическом съезде (Барнаул, 2008), на Международной конференции «Физиология и патология иммунной системы» (Москва, 2008), на XX и XXI съездах Физиологического общества им. И.П.Павлова (Москва, 2007; Калуга, 2010).

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук, Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 05-04-48899, 08-04-00837), Министерства науки и образования (грант 14.740.11.0918).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 работ, 6 из которых – статьи в рецензируемых журналах, 7 – тезисы докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 10 отечественных и 202 зарубежных источников. Работа изложена на 154 страницах машинописного текста, иллюстрирована 5 таблицами и 46 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на самцах травяной лягушки *Rana temporaria* L. в период с октября по май. Лягушек отлавливали в естественных условиях зимовки (на дне незамерзающих проточных водоемов) и содержали в лаборатории при температуре +5⁰С в емкостях, на 1-1.5 см заполненных водой.

Выделение и культивирование эпителиальных клеток мочевого пузыря. Внутреннюю полость мочевых пузырей у обездвиженной разрушением спинного мозга и вскрытой лягушки заполняли раствором, содержащим (в мМ): NaCl 85, KCl 4, NaHCO₃ 17.5, KH₂PO₄ 0.8, глюкоза 2, ЭДТА 2 (pH 7.6) (раствор «А»). Пузыри перевязывали, извлекали и помещали в раствор того же состава на 45 мин в условиях интенсивной аэрации. Мукозные растворы, содержащие клетки, центрифугировали 10 мин при 100 g. Клетки промывали в растворе «Б» (в мМ: NaCl 85, KCl 4, NaHCO₃ 17.5, KH₂PO₄ 0.8, MgCl₂ 0.8, глюкоза 2, CaCl₂ 1.5), содержащем 40 мкг/мл гентамицина. Изолированные клетки культивировали в модифицированной по осмоляльности среде L-15 с добавлением гентамицина при +23⁰С. Клетки эпителия сохраняли жизнеспособность в таких условиях до нескольких суток.

Определение содержания нитритов в культуральной среде. Концентрацию нитритов в культуральной среде определяли по методу Грисса с использованием растворов 1%-ного сульфаниламида и 0.1%-ного N-(1-нафтил)-этилендиамина, приготовленных в 2.5%-ной ортофосфорной кислоте [Green, 1982]. Оптическую плотность измеряли на планшетном ридере при длине волны 540-570 нм. В качестве стандартов использовали растворы нитрита натрия, приготовленных на модифицированной среде L-15.

Исследование активности NO-синтазы в гомогенате эпителиальных клеток. Клетки гомогенизировали в буфере, содержащем (в мМ) Tris-HCl 50, ЭДТА 1, ДТТ 1, глюкоза 5, PMSF 1 с добавлением 10 мг/мл пепстатина А и 20 мг/мл леупептина (pH 7.5). Гомогенаты клеток центрифугировали 15 мин при 12000 g. К 10 мкл супернатанта (60-100 мкг белка) добавляли 40 мкл реакционного буфера, содержащего 50 мМ HEPES, 1мМ ДТТ, 1.25 мМ CaCl₂, pH 7.5, а также кофакторы (1 мМ НАДФН, 10 мкМ ВН₄, 1.25 мкг/мл кальмодулина, 10 мкМ ФАД) и 0.5 мкл [³H]-L-аргинина (исходный раствор: 1 мКи/мл, специфическая активность 68 Ки/ммоль, Amersham). Полученную смесь инкубировали 1 час при 30⁰С. Реакцию останавливали добавлением 250 мкл холодного (+4⁰С) буфера, содержащего 100 мМ HEPES, 25 мМ ЭДТА (pH 5.5), и помещали на лед. Активность NOS определяли по количеству [³H]-L-цитруллина в реакционной смеси. Для разделения цитруллина и аргинина к пробам добавляли 125 мг ионообменной смолы DOWEX® 50WX-8, через 10 мин пробы центрифугировали и отбирали супернатант. Радиоактивность в супернатанте измеряли на β-счетчике (LKB 1209/1215 Rack-Beta).

Определение активности NO-синтазы и аргиназы в суспензии изолированных эпителиальных клеток. Эксперименты проводились на клетках, инкубированных в течение 21 часа, а также на свежесекретированных клетках. Каждая проба содержала около 2*10⁶ клеток. Клетки смывали с лунок культурального планшета, переносили в пробирки, дважды отмывали от среды раствором «Б» и ресуспендировали осадок в этом же растворе. Исследуемые ингибиторы добавляли за 20 мин до внесения аргинина. К суспензии добавляли смесь радиоактивного аргинина и «холодного» аргинина из расчета достижения концентрации аминокислоты в пробах 200-250 мкМ. Пробы инкубировали в течение 45 мин при 25⁰С, реакцию останавливали добавлением холодного 2 мМ

аргинина на растворе «Б». Клетки осаждали центрифугированием, промывали 1 мМ аргинина, лизировали в 30 мкл лизирующего буфера (50 мМ Трис-HCl, 4 мМ ЭДТА, рН 7.5) и центрифугировали. Аликвоту супернатанта наносили на силикагельные пластинки с алюминиевой подложкой (Merck, Германия) и подвергали хроматографическому разделению в системе этанол : аммиак (10:15, по объему). Зоны, соответствующие *L*-цитруллину и *L*-орнитину, вырезали, аминокислоты элюировали водой и определяли уровень радиоактивности. Оценка активности NOS производилась по накоплению [³H]-*L*-цитруллина, а аргиназы - по [³H]-*L*-орнитина.

Определение параметров транспорта *L*-аргинина. Для измерения входа *L*-аргинина в клетки суспензию подготавливали так же, как и для определения NO-синтазной активности. Концентрация «холодного» *L*-аргинина составляла от 0 до 250 мкМ. После инкубации клеток в течение 5 мин при 25⁰С включение радиоактивного аргинина в клетки останавливали добавлением двух объемов холодного (+4⁰С) раствора «Б», содержащего 2 мМ нерадиоактивного аргинина, затем клетки центрифугировали (10 мин, 100 g), осадок промывали раствором «Б», содержащим 1 мМ аргинина, клетки лизировали и определяли уровень радиоактивности в супернатанте.

Измерение активности аргиназы в гомогенатах тканей и клеток. Активность аргиназы определяли по модифицированному методу, приведенному в работе [Corraliza et al., 1994]. Фермент активировали, выдерживая аликвоту гомогената с содержанием белка около 100 мкг в течение 10 мин при 55⁰С в присутствии 1 мМ MnCl₂. Реакцию инициировали внесением аргинина в конечной концентрации 250 мМ, проводили при 37⁰С в течение 1 часа и останавливали добавлением 4х-кратного объема смеси H₂SO₄ : H₃PO₄ : H₂O (1:3:7. по объему). После остановки реакции к пробам добавляли 25 мкл 9%-ного спиртового раствора α-изонитрозопропиофенона, выдерживали 45 мин при 100⁰С и после охлаждения измеряли в них оптическую плотность на планшетном ридере при длине волны 570 нм. В качестве стандартов использовали растворы мочевины. Данные выражали в нмоль/мг белка/мин.

Иммуноблоттинг. Экспрессию исследуемых белков в пробах, содержащих лизат клеток или гомогенат тканей, оценивали методом иммуноблоттинга. Белки, выделенные из лизатов разгоняли на SDS-PAGE, затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану. В качестве первичных антител использовали антитела anti-uNOS (1:500, Affinity Bioreagents), anti-nNOS (1:500, Affinity Bioreagents), anti-arginase-II (1:300, Abcam), anti-TLR-4 (1:750, Abbiotech). Для визуализации результатов использовали систему ECL (Amersham Biosciences). Уровень экспрессии специфических белков был скорректирован по сигналу α/β-тубулина. Измерение концентрации белка в лизатах проводили по методу Брэдфорд.

Обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР). Эпителиальные клетки или ткань мочевых пузырей гомогенизировали в Trizol^e и выделяли РНК согласно протоколу производителя (Sigma). Чистоту полученных препаратов РНК определяли разделением на 1%-ном агарозном геле. ОТ-ПЦР с праймерами, специфическими к iNOS и GAPDH, проводили,

используя набор реактивов Titan One Tube RT-PCR system (Roche), согласно протоколу производителя. Продукты ПЦР анализировали в 2%-ном агарозном геле. Специфические праймеры были сконструированы с использованием программы Primer3. Принадлежность ПЦР-продуктов к iNOS и GAPDH подтверждали секвенированием.

Статистическая обработка результатов. Полученные данные обрабатывались статистически по парному и непарному t-критерию Стьюдента. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm полуширина доверительного интервала для среднего значения. Достоверными считались отличия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Идентификация изоформ NOS, присутствующих в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки. Оценивая накопление нитритов в культуральной среде и продукцию [^3H]-L-цитруллина изучаемыми клетками при добавлении радиоактивно-меченного субстрата, мы показали, что эпителиальные клетки мочевого пузыря лягушки обладают NO-синтазной активностью. Наиболее интересным представлялся вопрос, какие изоформы NOS присутствуют в изучаемых клетках. Известно, что в собирательных трубках почки млекопитающих экспрессируются все три изоформы NO-синтаз (эндотелиальная, нейрональная и индуцибельная) [Kone, 1997; Wang et al., 1998; Chen et al., 2002; Martin et al., 2002]. Мочевой пузырь бесхвостых амфибий функционально сходен с собирательными трубками почки млекопитающих, поэтому можно было ожидать, что в клетках эпителия мочевого пузыря лягушки также экспрессируются несколько изоформ фермента. Для определения изоформ NOS мы использовали различные подходы: исследование кальциевой зависимости активности фермента, применение селективных ингибиторов конститутивных и индуцибельной изоформ, иммуноблоттинг с использованием специфических и универсальных антител, ОТ-ПЦР.

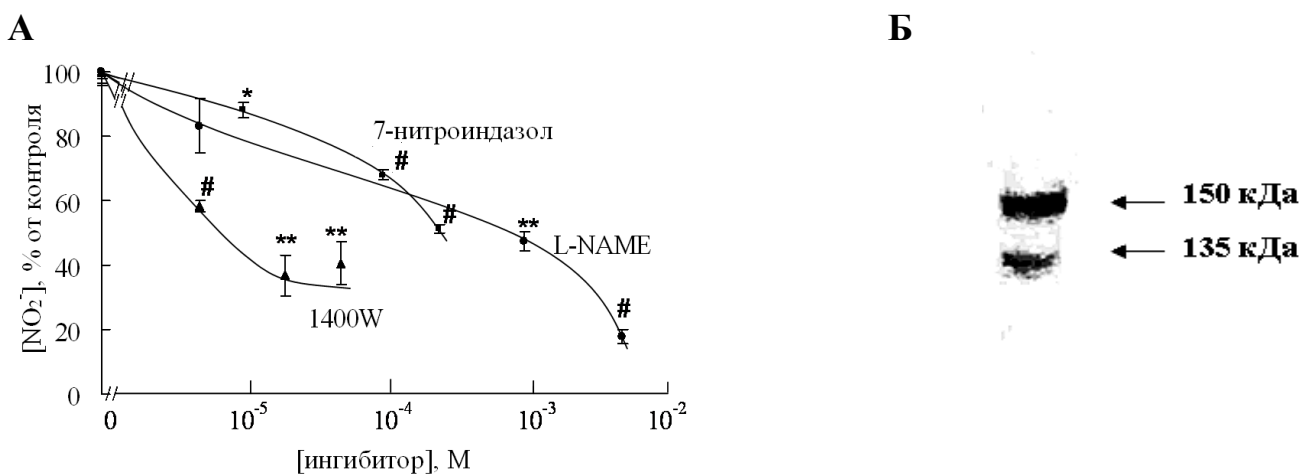


Рис. 1. Влияние ингибиторов NOS на накопление нитритов в культуральной среде за 21 час инкубации (А); иммуноблоттинг лизата клеток с универсальными антителами iNOS (Б). * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, # - $p < 0.001$ по сравнению с контролем, $n = 5$.

домена. Исходя из этого, были сконструированы праймеры (прямой – AGCATCACCCCTGTGTTCCACCC, обратный – TGGGGCAGTCTCCATTGCCA; размер ПЦР-продукта – 388 п.н.). Секвенирование полученного ПЦР-продукта подтвердило его принадлежность к iNOS. Трансляция нуклеотидной последовательности в аминокислотную позволила нам сравнить участок белка iNOS лягушки и других животных. Выравнивание аминокислотных последовательностей показало, что идентифицированный участок на 70% идентичен последовательности iNOS курицы, на 61-66% – последовательностям iNOS различных млекопитающих и на 51-53% совпадает с аминокислотной последовательностью iNOS различных рыб (рис. 2). Идентифицированная последовательность была размещена в базе данных GenBank (accession number GU086402).

2. Влияние бактериального эндотоксина ЛПС *E. coli* на продукцию нитритов изолированными эпителиальными клетками. Несмотря на то, что мы выявили присутствие двух изоформ NO-синтазы в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки, дальнейшая работа, в основном, была сфокусирована на исследовании регуляции продукции NO, обеспечиваемой индуцибельной изоформой NOS.

В ходе работы с клетками эпителия мочевого пузыря лягушки было обнаружено, что мочевой пузырь лягушки может быть колонизован бактериями. Анализ состава бактериальной микрофлоры показал наличие грамотрицательных бактерий, в том числе лактозонегативной *E. coli*. В связи с этим исследовали действие ЛПС *E. coli* (компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий), классического активатора экспрессии iNOS, на NO-синтазную активность в изучаемых клетках. Эксперименты проводили на изолированных эпителиальных клетках при их 21-часовой инкубации в присутствии ЛПС. Исследование временной и концентрационной зависимостей эффекта ЛПС показало, что ЛПС стимулировал накопление нитритов, проявляя эффект в концентрациях свыше 1 мкг/мл (рис. 3, А, Б). Стимулирующий эффект ЛПС на накопление нитритов полностью снимался в присутствии 20 мкМ 1400W. Аналогичные результаты были получены при исследовании действия ЛПС на активность NOS, определяемую по продукции [³H]-L-цитруллина (рис. 3, В).

Анализ экспрессии мРНК iNOS в изолированных эпителиальных клетках проводили через 6, 22 и 46 часов инкубации с ЛПС или без него. Оказалось, что уже через 6 часов инкубации увеличивается экспрессия мРНК iNOS, которая резко стимулируется в присутствии ЛПС. На более длинных сроках инкубации наблюдается постепенное снижение уровня экспрессии как в контрольных, так и в ЛПС-стимулированных клетках (рис.3, Г). В качестве внутреннего стандарта для количественной оценки уровня экспрессии iNOS использовали ген «домашнего хозяйства» *gapdh*. Праймеры для него конструировали, используя известную последовательность этого гена у хоккайдской лягушки *Rana pirica* (GenBank: FS290153.1). Последовательности праймеров: 5'-AAGGCTTCTGCTCACTTGAAGG-3', 3'-TATGAGATCCACCACACGGTT-5'. Исследование уровня экспрессии белка iNOS методом иммуноблоттинга

показало, что эффект ЛПС на уровень экспрессии максимально выражен через 21 час инкубации (рис. 3, Д).

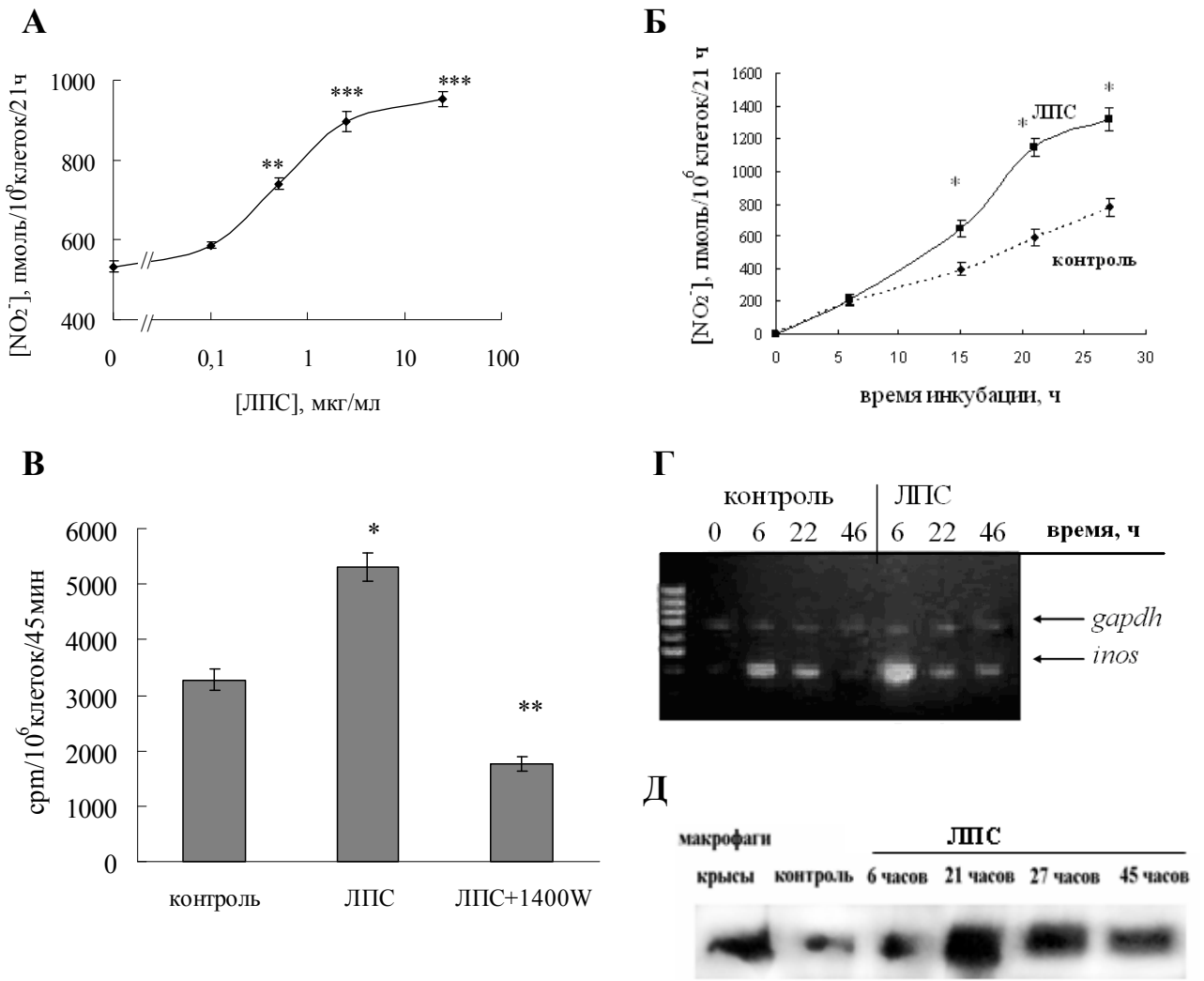


Рис. 3. Влияние ЛПС и 1400W на NO-синтазную активность. **А.** Действие различных доз ЛПС на продукцию нитритов в первичной культуре эпителиальных клеток за 21 час инкубации. ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$ по сравнению с контролем, $n=4$. **Б.** Динамика накопления нитритов в культуральной среде в течение 0 – 28 часов культивирования клеток. * - $p < 0.01$, $n=5$. **В.** Продукция [³H]-L-цитруллин эпителиальными клетками, прединкубированными в течение 21 часа с ЛПС или без него. * - $p < 0.01$ по сравнению с контролем, ** - $p < 0.01$ по сравнению с ЛПС, $n=4$. **Г.** Изменение экспрессии мРНК iNOS под действием ЛПС. **Д.** Изменение экспрессии белка iNOS под действием ЛПС. Используемые концентрации (рис. Б – Д): ЛПС – 25 мкг/мл, 1400W – 20 мкМ. *

Интересно, что некоторое усиление экспрессии мРНК и белка iNOS наблюдается в инкубируемых клетках и в отсутствие ЛПС. Об этом свидетельствует эффект 1400W на накопление нитритов в культуральной среде (рис.1, А) и активация экспрессии мРНК iNOS (рис.3, Г) в контроле. Возможным объяснением ЛПС-независимого увеличения экспрессии iNOS и продукции NO в изучаемых клетках может быть тот факт, что извлечение и инкубация in vitro мочевых пузырей, а также последующая дезинтеграция эпителия могут приводить к высвобождению эндогенных стимулов, известных как DAMPs

(damage-associated molecular patterns), таких как белки теплового шока, гиалуроновая кислота, клеточная ДНК и другие молекулы, которые могут активировать TLR-сигналинг и приводить к развитию неспецифического иммунного ответа [Ben Mkaddem et al., 2010].

3. Оценка вклада фагоцитирующих клеток в эффект ЛПС на продукцию нитритов. Хорошо известно, что эффекты ЛПС могут быть активированы в «профессиональных» иммунокомпетентных клетках, таких как резидентные макрофаги. Необходимо было выяснить, является ли наблюдаемая нами реакция клеток на ЛПС характерной именно для эпителиальных клеток, а не для макрофагов, которые могут присутствовать в суспензии клеток.

Действительно, в нашей суспензии присутствовало небольшое количество клеток, отличающихся высокой способностью к адгезии и фагоцитозу. Прикрепившиеся клетки эффективно фагоцитировали флуоресцентные биочастицы *E. coli* (рис. 4, А). Однако эффект ЛПС проявлялся в одинаковой степени как в общей суспензии клеток, так и в суспензии, очищенной от прикрепившихся фагоцитирующих клеток, о чем свидетельствует степень увеличения активности NOS, оцениваемая по накоплению [³H]-L-цитруллина (рис. 4, Б). Аналогичные результаты были получены при оценке продукции нитритов в обеих суспензиях (данные не показаны).

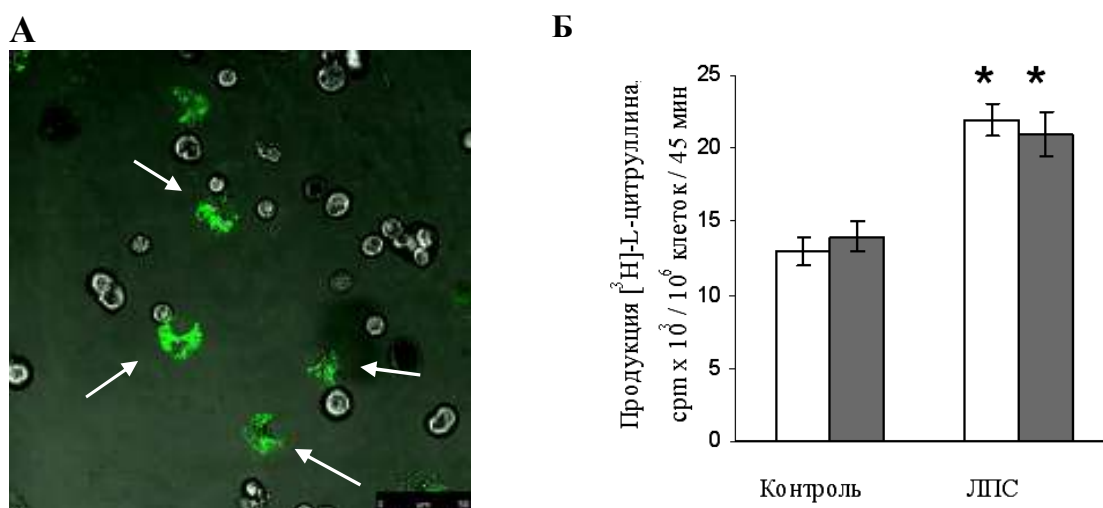


Рис. 4. Фагоцитоз биочастиц (флуоресцентно-меченных *E. coli*, линия K-12) клетками, выделенными из мочевого пузыря лягушки. Фотография предоставлена Е.М.Фок (А). Сравнение активности NOS в общей (светлые столбики) и очищенной от фагоцитирующих клеток (темные столбики) суспензиях эпителиальных клеток (Б). * - $p < 0.01$ по сравнению с соответствующим контролем, $n=4$.

Таким образом, присутствие макрофагоподобных клеток не вносит вклад в продукцию NO, и эффект ЛПС локализуется в самих эпителиальных клетках.

4. Обнаружение рецептора TLR4. Известно, что в основе узнавания ЛПС и инициации врожденного иммунного ответа у млекопитающих лежит чрезвычайно сложная сигнальная цепь, начинающаяся со связывания ЛПС со

специфическими рецепторами TLR4 и образования комплекса, включающего в себя ЛПС с ЛПС-связывающим белком, собственно TLR4 и белки mCD14 и MD-2. Стимуляция TLR4 под действием ЛПС приводит к высвобождению транскрипционных факторов таких, как например, NF- κ B, которые активируют иммунный ответ, запуская экспрессию различных генов. Представляло интерес выяснить возможность экспрессии TLR4 в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки и выявить его участие в эффекте ЛПС на стимуляцию продукции NO.

Методом иммуноблоттинга с использованием антител против TLR4 мы обнаружили экспрессию белка с молекулярной массой около 100 кДа в эпителиальных клетках мочевого пузыря и лейкоцитах лягушки, что совпадает с размером TLR4. В качестве позитивного контроля были использованы лейкоциты крысы (рис. 5, А). Чтобы показать, что действие ЛПС на изучаемые клетки опосредуется его связыванием со специфическим рецептором, был использован полимиксин В, блокирующий связывание ЛПС с рецептором TLR4. Полимиксин В (50 мкг/мл) полностью снимал стимулирующий эффект ЛПС на продукцию NO (рис. 5, Б).

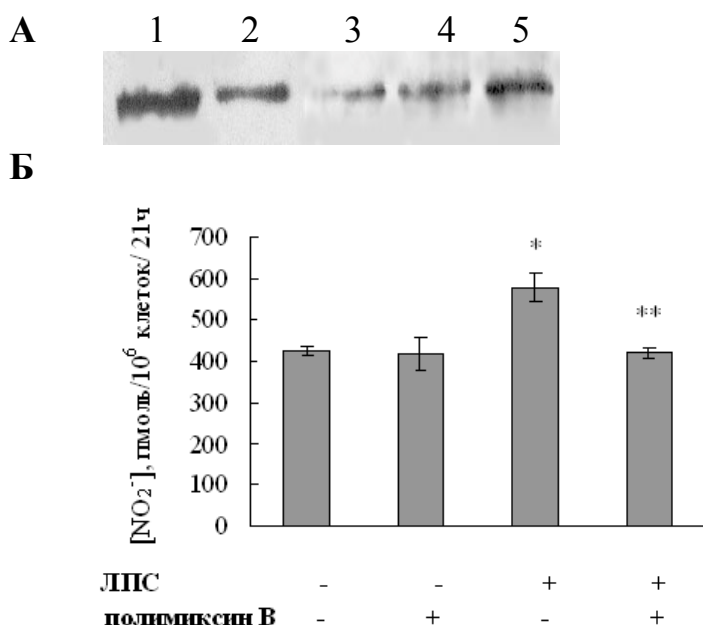


Рис. 5. Обнаружение рецептора TLR4. **А.** Иммуноблоттинг с использованием антител против TLR-4: лизат лейкоцитов крысы (1), лизат лейкоцитов лягушки (2), лизаты эпителиальных клеток (3-5). **Б.** Действие полимиксина В на ЛПС-стимулированное накопление нитритов в культуральной среде. ЛПС – 25 мкг/мл, полимиксин В – 50 мкг/мл. * - $p < 0.01$ по сравнению с контролем, ** - $p < 0.01$ по сравнению с ЛПС, $n = 4$.

Таким образом, проведенное нами исследование свидетельствует о наличии в клетках эпителия мочевого пузыря лягушки молекулярного механизма распознавания бактериальных стимулов, активация которого приводит к индукции iNOS.

Хорошо известно, что увеличение продукции NO при действии бактериальных патогенов является важной частью неспецифического иммунного ответа. NO может вызывать повреждения ДНК, белков и липидов бактериальной клетки, основанные на взаимодействиях NO с активными формами кислорода, прямых взаимодействиях NO с различными реакционно-способными группами в белковых молекулах [Fang, 1997; Chakravorty, Hensel, 2003]. В нашей лаборатории было показано, что изоляты бактерий, выделенные из эпителия мочевого пузыря лягушки, чувствительны к действию доноров NO.

Совокупность этих данных позволяет предположить, что основной функцией iNOS в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки является ее участие в неспецифической иммунной защите клеток эпителия.

5. Участие циклооксигеназы и простагландина E₂ в регуляции экспрессии iNOS. На различных экспериментальных моделях было показано, что индукция iNOS при действии воспалительных стимулов сопровождается изменением активности циклооксигеназы (COX), обеспечивающей образование эйкозаноидов из арахидоновой кислоты. Известно, что NO может влиять на экспрессию COX и на синтез простагландинов [Yang, 2006]. Другие исследования свидетельствуют об эффекте продуктов COX на экспрессию iNOS и синтез NO [Aeberhard et al 1995; West et al, 2008]. Особое значение в этом процессе имеет индуцибельная форма фермента (COX-2). Представляло интерес выяснить, участвует ли COX и продукты ее каталитической активности в регуляции продукции NO в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки.

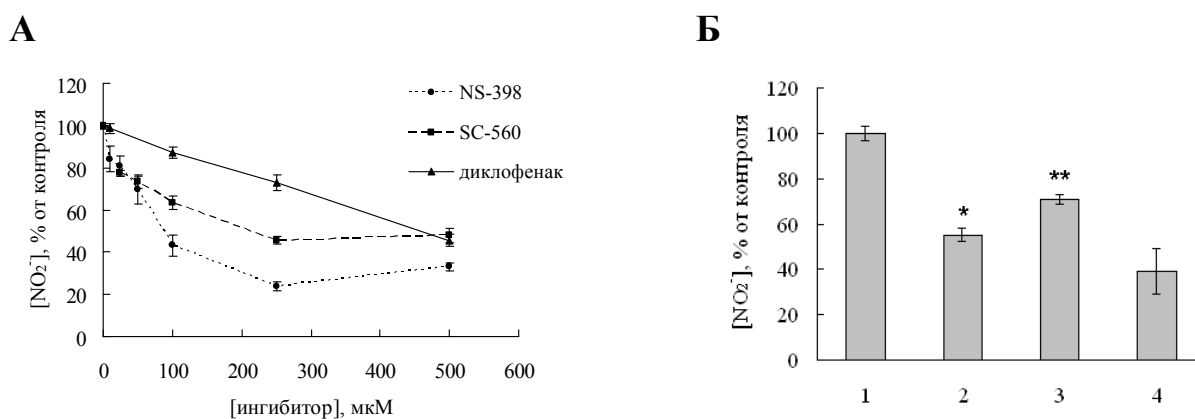


Рис. 6. А. Продукция нитритов в первичной культуре эпителиальных клеток мочевого пузыря лягушки под действием ингибиторов COX. Контроль – 0.5% DMSO. Для всех ингибиторов снижение содержания нитритов в культуральной среде было достоверно при концентрации ингибитора 50 мкМ и выше ($p < 0.01$), $n = 4$. **Б.** Эффект простагландинов на продукцию нитритов: 1. 0.05% спирт; 2. 0.05% спирт + 0.25 мМ диклофенак; 3. 0.25 мМ диклофенак + 0.1 мкМ ПГЕ₂; 4. 0.25 мМ диклофенак + 0.1 мкМ ПГФ₂α. * – $p < 0.01$ по сравнению с контролем, ** – $p < 0.05$ по сравнению с серией 2, $n = 3$.

Мы исследовали влияние селективных ингибиторов COX-1 и COX-2 (SC-560 и NS-398, соответственно), а также диклофенака, неспецифического ингибитора обеих изоформ, на накопление нитритов в культуральной среде за 21 час инкубации клеток. Все используемые ингибиторы резко снижали накопление нитритов: величина IC₅₀ составляла 90, 220 и 470 мкМ для NS-398, SC-560 и диклофенака, соответственно (рис. 6, А). Наблюдаемое снижение продукции NO при действии диклофенака частично восстанавливалось при добавлении ПГЕ₂, основного продукта каталитической активности COX. ПГФ₂α был не эффективен (рис. 6, Б).

Чтобы выяснить, связано ли действие ингибиторов COX на продукцию NO с изменением уровня экспрессии iNOS, мы оценивали экспрессию мРНК iNOS в

клетках, обработанных ЛПС в присутствии NS-398 и SC-560. Методом ОТ-ПЦР показано, что добавление селективных ингибиторов приводит к резкому снижению ЛПС-стимулированной экспрессии мРНК iNOS (рис. 7).

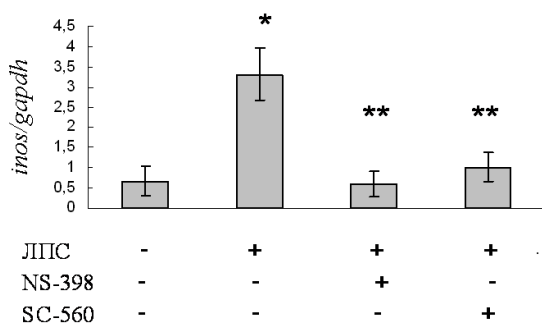


Рис. 7. Влияние ингибиторов циклооксигеназ на ЛПС-стимулированную экспрессию iNOS. ОТ-ПЦР со специфическими праймерами на iNOS (количественная оценка уровня экспрессии мРНК iNOS выражена в виде отношения оптических плотностей inos/gapdh). ЛПС - 25 мкг/мл, NS-398 и SC-560 - 50 мкМ. * - $p < 0.01$ по сравнению с контролем, ** - $p < 0.01$ по сравнению с ЛПС.

Таким образом, мы показали, что экспрессия iNOS в изучаемых клетках критично зависит от продуктов каталитической активности COX, в первую очередь, ПГЕ₂. Исходя из полученных нами данных следует, что в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки активность циклооксигеназы и, как следствие, увеличение продукции простагландина Е₂ предшествует и является необходимым звеном в цепи активации iNOS.

В нашей лаборатории было показано, что наблюдаемое снижение продукции NO при действии диклофенака частично восстанавливалось при добавлении бутапроста (агониста цАМФ-мобилизующих EP₂-рецепторов) и форсколина [Бахтеева и др., 2011]. Таким образом, можно предположить, что эффект COX на активность iNOS, по всей вероятности, обеспечивается усилением продукции ПГЕ₂ и EP₂-рецептор-опосредованным увеличением цАМФ. Опираясь на данные литературы [Galea et al., 1999], можно предположить, что цАМФ-зависимая сигнальная система активирует транскрипционные факторы семейства CREB, которые повышают транскрипцию гена, кодирующего iNOS, результатом чего является увеличение iNOS-зависимой продукции NO.

6. Механизмы регуляции продукции NO на уровне доступности субстрата. Дальнейшая часть исследований была посвящена изучению механизмов регуляции продукции NO на уровне доступности субстрата NOS - L-аргинина. Известно, что хотя внутриклеточная концентрация аргинина во много раз превышает величину К_м для NOS, активность фермента значительно зависит от поступления субстрата из внеклеточной среды (так называемый «парадокс аргинина») и от «биодоступности» субстрата для NOS внутри клетки.

Описано четыре системы транспорта аргинина в клетку: y^+ , y^+L , $b^{0,+}$ и $B^{0,+}$, отличающиеся по кинетическим характеристикам, способности транспортировать другие катионные и нейтральные аминокислоты, зависимости транспорта от натрия.

Для определения величины К_М и V_{max} транспортера аргинина эпителиальные клетки инкубировали 5 мин в присутствии аргинина в диапазоне концентраций от 0 до 250 мкМ (рис. 8, А). Об активности транспортера судили по накоплению радиоактивно-меченного L-аргинина в клетках. Для определения

величины K_M мы привели эти данные к координатам Лайнуивера-Бэрка (рис. 8, Б), что дало величину K_M для аргинина 43 мкМ, а максимальную скорость реакции – 2.3 пмоль/ 10^6 клеток/мин. Такая величина K_M характерна для переносчиков катионных аминокислот y^+ типа [Palacin et al., 1998; Saibara et al., 2001].

В последующих экспериментах исследовали зависимость входа аргинина в клетки от присутствия в среде ионов натрия. Для создания безнатриевой среды NaCl в растворе заменяли эквивалентным количеством хлорида холина. Натриевую зависимость исследовали при двух концентрациях аргинина 100 мкМ и 300 мкМ. Данные эксперимента показали, что вход аргинина в клетки не зависит от натрия (рис. 8, В), что также указывает на активность системы транспорта y^+ или y^+L типа в изучаемых клетках.

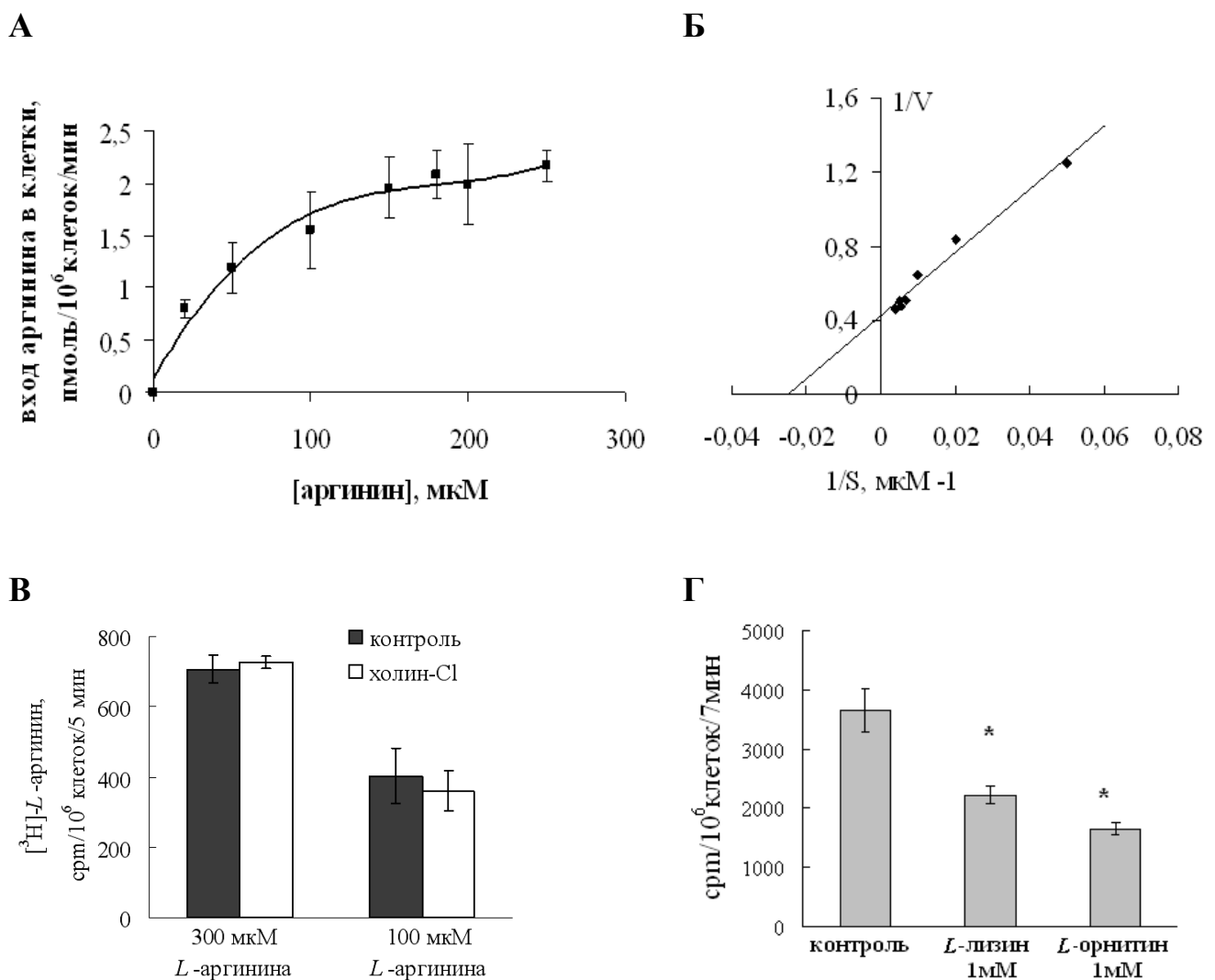


Рис. 8. Характеристика входа L-аргинина в эпителиальные клетки мочевого пузыря лягушки. **А.** Кривая субстратного насыщения транспортера. **Б.** То же в координатах Лайнуивера-Бэрка. **В.** Зависимость входа L-аргинина от внеклеточного натрия. Темные столбики – контроль, $[Na]=85$ мМ; белые столбики – без натрия, концентрация хлорида холина 85 мМ. **Г.** Влияние L-лизина и L-орнитина на вход аргинина. * – $p<0.01$, $n=4$.

Известно, что транспорт аргинина, опосредованный переносчиками y^+ и y^+L типов, угнетается в присутствии других катионных аминокислот – лизина и орнитина. Мы измеряли накопление [3H]-L-аргинина в клетках эпителия мочевого пузыря лягушки при добавлении L-орнитина и L-лизина.

Оказалось, что L-орнитин в концентрации 1мМ ингибировал транспорт аргинина в клетки на 54.8%, а в присутствии 1 мМ L-лизина вход аргинина снижался на 39.2% по сравнению с контролем (рис. 8, Г).

Таким образом, мы показали, что в клетках эпителия мочевого пузыря лягушки функционирует система транспорта аргинина, которая не зависит от присутствия ионов натрия, угнетается в присутствии L-орнитина и L-лизина, что позволяет отнести ее к транспортерам аминокислот y^+ или y^+L типа. Полученная величина K_m (43 мкМ) свидетельствует о том, что транспорт L-аргинина в данном типе клеток осуществляется посредством транспортера y^+ типа. Наличие и функционирование данной системы транспорта характерно для большинства клеток, реагирующих на бактериальные стимулы и участвующих в обеспечении неспецифической иммунной защиты [Pan et al., 2002; Meng et al., 2005; Rothenberg et al., 2006; Yeramian et al., 2006; Niese et al., 2010].

Известно, что iNOS и транспортер катионных аминокислот могут быть индуцированы в клетках млекопитающих различных типов при развитии воспалительных реакций, активируемых различными цитокинами, образующимися в клетке при повреждениях и при действии бактериальных стимулов. В рамках данной работы представляло интерес выяснить, участвует ли система транспорта аргинина в обеспечении эффекта ЛПС на активность NOS в клетках эпителия мочевого пузыря лягушки. Инкубация клеток с ЛПС в течение 21 часа приводила к увеличению транспорта аргинина на 28% (рис. 9).

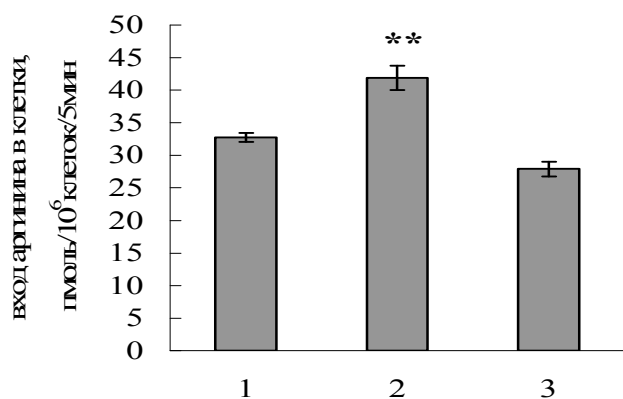


Рис. 9. Вход L-аргинина в эпителиальные клетки, преинкубированные в течение 21 ч с ЛПС или без него:

1. контроль;
2. 25 мкг/мл ЛПС;
3. 25 мкг/мл ЛПС, $2 \cdot 10^{-5}$ М 1400W. ** - $p < 0.01$ по сравнению с контролем, $n=4$.

Чрезвычайно интересно, что 1400W, ингибитор активности iNOS, угнетал ЛПС-стимулированный вход аргинина (рис. 9). Этот факт свидетельствует о том, что усиление экспрессии iNOS и продукции NO приводит к активации системы транспорта аргинина. Механизм влияния самого NO на транспорт предшественника в эпителиальные клетки мочевого пузыря лягушки остается неизвестным. Возможным объяснением действия NO на транспорт аргинина может являться тот факт, что транспортеры системы y^+ чувствительны к изменению мембранного потенциала – гиперполяризация мембраны приводит к сильной стимуляции транспортера [Closs et al., 2004]. Было показано, что NO-опосредованная гиперполяризация плазматической мембраны увеличивает вход

L-аргинина в клетку [Queen et al., 2006]. Можно предположить, что такая регуляция транспорта *L*-аргинина и его зависимость от активности NO-синтазы является необходимой для предотвращения повреждения клеток побочными продуктами синтеза NO, такими как супероксид (O_2^-) и перекись водорода, которые синтезируются NOS в условиях недостатка субстрата. Известно, что вход *L*-аргинина в клетку из внеклеточной среды играет важную роль в поддержании жизнеспособности клеток при окислительном стрессе [Suschek et al., 2003].

Еще одним молекулярным механизмом регуляции продукции NO в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки может быть регуляция активности или экспрессии аргиназы, превращающей *L*-аргинин в *L*-орнитин и конкурирующей таким образом с NOS за общий субстрат.

Исследование активности аргиназы в разных органах и тканях лягушки показало, что, как и следовало ожидать, наибольший уровень активности фермента был обнаружен в гомогенатах печени и почки (рис.10, А). Активность аргиназы в других исследованных органах распределяется следующим образом: мозг > мочевой пузырь (эпителий) > сердце > семенники. В изолированных эпителиальных клетках мочевого пузыря активность фермента почти в 3 раза выше, чем в стенке интактного мочевого пузыря (таблица 1). Таким образом, эпителиальные клетки мочевого пузыря обладают относительно высокой аргиназной активностью.

Известны две изоформы аргиназы – аргиназа I и аргиназа II, каждая из которых кодируется отдельным геном. Аргиназа I экспрессируется преимущественно в печени и участвует в «цикле мочевины», тогда как аргиназа II обнаруживается в почке и других тканях [Morris et al., 1997]. Экспрессия аргиназы в лизате эпителиальных клеток оценивалась с помощью метода иммуноблоттинга с использованием специфических антител против аргиназы I и II. В качестве положительного контроля связывания антител мы использовали лизаты печени и почки крысы и лягушки. В результате иммуноблоттинга с антителами против аргиназы II в зоне интереса была обнаружена полоса размером 37 кДа, что соответствует молекулярному весу аргиназы млекопитающих (рис. 10).

Ткань	mU/мг белка/мин
Печень	131.5 ± 2.5
Почки	99.5 ± 5.5
Мозг	13.2 ± 1.7
Семенники	0.9 ± 0.1
Сердце	1.8 ± 0.5
Мочевой пузырь(стенка)	3.3 ± 0.7
Эпителиальные клетки мочевого пузыря	9.2 ± 0.3

Таблица 1. Активность аргиназы в некоторых органах и тканях лягушки *Rana temporaria*.

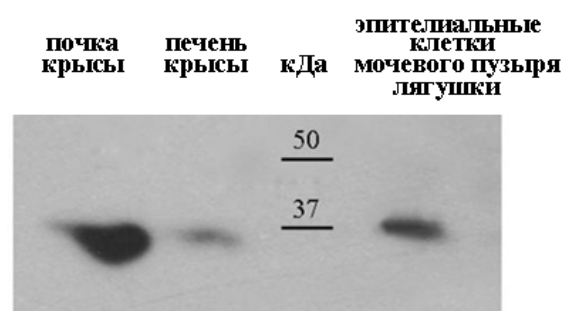


Рис. 10. Результаты иммуноблоттинга с использованием антител против аргиназы II.

Иммуноблоттинг с использованием антител против аргиназы I не выявил экспрессии этой изоформы фермента в изучаемых клетках, хотя антитела связывались с аргиназой I печени лягушки (данные не представлены).

Представляло интерес исследовать влияние ЛПС на активность и уровень экспрессии аргиназы в изучаемых нами клетках. Оказалось, что бактериальный эндотоксин достоверно не менял ни активность, ни уровень экспрессии фермента (данные не приведены). Тем не менее, эксперименты с применением неселективного ингибитора обеих изоформ аргиназы (S)-(2-бороноэтил)-L-цистеина (ВЕС), позволили выявить наличие конкурентных отношений между аргиназой и NOS как в контрольных, так и в ЛПС-стимулированных клетках. Предварительно необходимо было выяснить, действительно ли данный ингибитор угнетает активность аргиназы в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки. Применение ВЕС в наших экспериментах показало, что он в диапазоне концентраций от 10^{-6} до 10^{-4} М чрезвычайно эффективно тормозил активность фермента (рис. 11, А). Использование наибольшей дозы подавляло активность аргиназы на 93%.

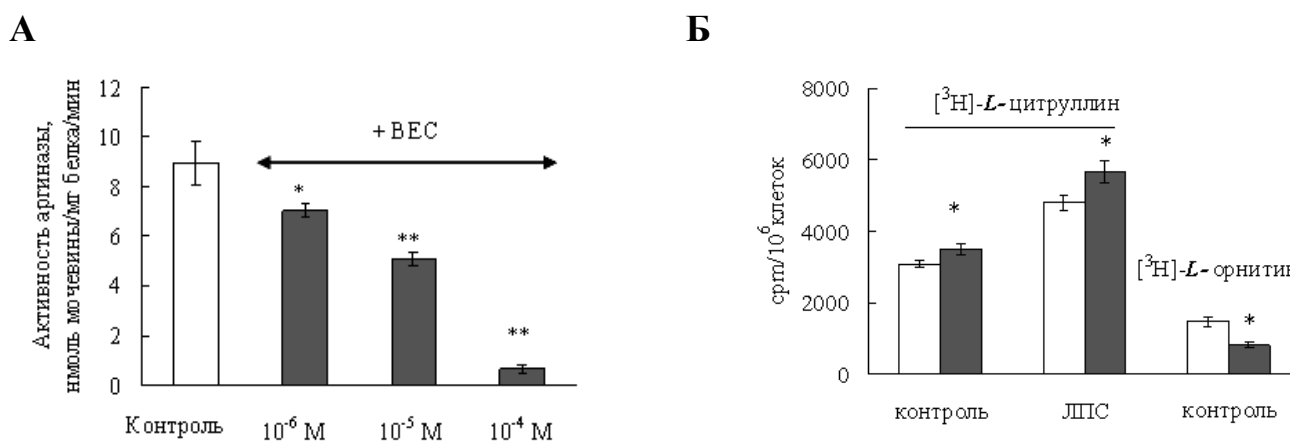


Рис. 11. А. Влияние ВЕС на активность аргиназы в гомогенате эпителиальных клеток мочевого пузыря лягушки. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ по сравнению с контролем, $n=5$. Б. Влияние ВЕС на накопление [³H]-L-цитруллина и [³H]-L-орнитина изолированными эпителиальными клетками. Светлые столбики – контроль, темные – 10^{-4} М ВЕС. Концентрация ЛПС составляла 25 мкг/мл. * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем, $n=4$.

Убедившись в том, что ВЕС способен ингибировать аргиназу лягушки, мы попытались выяснить, участвует ли аргиназа эпителия мочевого пузыря в регуляции продукции NO. Был использован метод, позволяющий проводить одновременную оценку активности обоих ферментов в интактных эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки. Эксперименты проводили на клетках, инкубированных в течение 21 часа с ЛПС или без него, нагружали [³H]-L-аргинином, после чего оценивали продукцию [³H]-L-орнитина и [³H]-L-цитруллина, разделяя радиоактивные продукты методом тонкослойной хроматографии. Оказалось, что в интактных клетках ВЕС (100 мкМ) действительно снижал активность аргиназы, о чем свидетельствует снижение синтеза [³H]-L-орнитина, при этом увеличивался уровень [³H]-L-цитруллина как в контрольных, так и в ЛПС-стимулированных клетках (рис. 11, Б).

Аналогичный эффект ВЕС на активность NOS был обнаружен при анализе уровня нитритов в культуральной среде (данные не приведены). Таким образом, с помощью этих подходов мы показали наличие тесной связи между активностью аргиназы и уровнем продукции NO, в основе которой лежит конкуренция ферментов за общий субстрат.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование показало, что в эпителии мочевого пузыря лягушки экспрессируются, по крайней мере, две изоформы NOS – нейрональная и индуцибельная. Продуктируемый ими NO может играть как регуляторную роль, участвуя в модуляции действия АДГ на транспорт воды, так и защитную роль, обеспечивая неспецифический иммунный ответ. Полученные данные продемонстрировали, что эпителиальные клетки имеют систему распознавания бактериальных патогенов и отвечают на их присутствие индукцией iNOS, опосредованной продуктами каталитической активности циклооксигеназы. Регуляция синтеза NO в изучаемых клетках осуществляется посредством дополнительных молекулярных механизмов, включающих iNOS-зависимое увеличение транспорта *L*-аргинина в клетку и вовлечение аргиназы как ферментной системы, конкурирующей с NOS за общий субстрат.

ВЫВОДЫ

1. Продукция NO в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки *Rana temporaria* обеспечивается экспрессией двух изоформ NOS: nNOS и iNOS.
2. Определена нуклеотидная последовательность фрагмента кДНК iNOS, соответствующая участку белка, содержащему часть оксигеназного домена, полноразмерный кальмодулин-связывающий домен и часть редуктазного домена (GenBank: GU086402).
3. Экспрессия мРНК и белка iNOS и продукция NO в эпителиальных клетках стимулируется ЛПС *E. coli*. Этот эффект обусловлен связыванием ЛПС с рецептором TLR4, экспрессия которого была выявлена в данных клетках. В исследуемой суспензии обнаружены макрофагоподобные клетки, способные к фагоцитозу, однако эффект ЛПС на экспрессию iNOS реализуется в эпителиальных клетках.
4. Продукция NO эпителиальными клетками тормозится в присутствии ингибиторов COX-1 и COX-2, которые полностью предотвращали стимулирующее действие ЛПС *E. coli* на экспрессию мРНК iNOS. ПГЕ₂ обладал способностью частично восстанавливать ингибирующий эффект диклофенака на продукцию NO. Таким образом, в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки экспрессия iNOS критично зависит от уровня активности COX.
5. Охарактеризованы параметры входа *L*-аргинина в эпителиальные клетки, которые позволяют предположить активность системы транспорта катионных аминокислот у⁺ типа. Транспорт *L*-аргинина в клетку усиливается при действии ЛПС и тормозится ингибитором iNOS, что свидетельствует о

наличии сопряжения между уровнем активности iNOS и системой доставки субстрата в клетку.

6. В исследуемых клетках обнаруживается относительно высокая аргиназная активность, обеспечиваемая экспрессией аргиназы II. ЛПС не влияет на активность и уровень ее экспрессии, однако, ингибирование аргиназы приводит к увеличению продукции NO эпителиальными клетками, по-видимому, за счет изменения доступности *L*-аргинина для NOS.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Бахтеева В.Т., Фок Е.М., Лаврова Е.А., Горбушин А.М., Романова И.В., **Николаева С.Д.**, Парнова Р.Г. Обнаружение NO-синтазной активности в клетках мукозного эпителия мочевого пузыря лягушки. // Росс. физиол. журн. им. И. М.Сеченова. 2006. Т. 92. N 8. С. 1022-1028.

2. Bachtееva V., Fock E., Lavrova E., **Nikolaeva S.**, Gambaryan S., Parnova R. Prostaglandin E2 inhibits vasotocin-induced osmotic water permeability in the frog urinary bladder by EP1-receptor-mediated activation of NO/cGMP pathway. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2007. V. 293. P. R528-R537.

3. **Николаева С.Д.**, Бахтеева В.Т., Фок Е.М., Лаврова Е.А., Парнова Р.Г. Активность аргиназы в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки и ее участие в регуляции продукции оксида азота. // Журн. эвол. биохим. физиол. 2008. Т. 44. N 3. С. 234-240.

4. Фок Е.М., Бахтеева В.Т., Лаврова Е.А., **Николаева С.Д.**, Парнова Р.Г. Исследование NO-синтазной активности и обнаружение NO-зависимого антибактериального эффекта в первичной культуре клеток эпителия мочевого пузыря лягушки. // Цитология. 2008. Т. 50. N 10. С. 895-900.

5. Е.А.Лаврова, **С.Д.Николаева**, Е.М.Фок, В.Т.Бахтеева, Р.Г.Парнова. Липополисахарид *E. coli* ингибирует увеличение осмотической проницаемости мочевого пузыря лягушки, стимулированное аргинин-вазотоцином. // Росс. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. 2009. Т. 95. N 3. С. 215 – 224.

6. Бахтеева В.Т., Федотов Т.М., **Николаева С.Д.**, Лаврова Е.А., Фок Е.М., Парнова Р.Г. Регуляторные взаимоотношения циклооксигеназы и индуцибельной NO-синтазы в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки при действии бактериальных стимулов. // Журн. эвол. биохим. физиол. 2011. Т.47. N. 1. С. 27-33.

Тезисы докладов

1. Парнова Р.Г., Бахтеева В.Т., Лаврова Е.А., **Николаева С.Д.**, Фок Е.М., Черниговская Е.В. Типы NO-синтаз и исследование NO-синтазной активности в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки. // 1 Съезд физиологов СНГ “Физиология и здоровье человека”. Сочи, Дагомыс. 2005. Сборник тезисов. Т. 2. С. 13.

2. **Николаева С.Д.**, Парнова Р.Г. Обнаружение NO-синтазной активности в первичной культуре эпителиальных клеток мочевого пузыря лягушки. // Всероссийская межвузовская научно-техническая конференция студентов и аспирантов. Санкт-Петербург. 2005. Тезисы докладов. С. 28-29.

3. Бахтеева В.Т., Фок Е.М., **Николаева С.Д.**, Парнова Р.Г. Обнаружение NO-синтазы нейронального типа в клетках мукозного эпителия мочевого пузыря лягушки. // XIII Международное совещание и VI Школа по эволюционной физиологии. Санкт-Петербург. 2006. Тезисы докладов и лекций. С. 26-27.

4. Парнова Р.Г., Бахтеева В.Т., Фок Е.М., Лаврова Е.А., **Николаева С.Д.** Обнаружение нового молекулярного механизма действия простагландина E2 в регуляции транспорта воды в осморегулирующем эпителии амфибий: роль NO-синтазы нейронального типа. // XX Съезд физиол. общества им. И.П.Павлова. Москва. 2007. Тезисы докладов. С. 72.

5. **Николаева С.Д.**, Фок Е.М., Лаврова Е.А., Бахтеева В.Т., Парнова Р.Г. (2008) Экспрессия и функциональная роль индуцибельной NO-синтазы в клетках осморегулирующего эпителия мочевого пузыря лягушки. // VI Сибирский физиологический съезд. Барнаул. 2008. Тезисы докладов. Т.2. С. 16.

6. Парнова Р.Г., **Николаева С.Д.**, Бахтеева В.Т., Фок Е.М., Лаврова Е.А.. Молекулярные механизмы регуляции iNOS-зависимой продукции NO в обеспечении иммунной защиты эпителиальных клеток мочевого пузыря амфибий. // Международная конференция «Физиология и патология иммунной системы». Москва. 2008. журн. Аллергология и иммунология. 2008. Т.9. N. 3. С. 268.

7. **Николаева С.Д.**, Фок Е.М., Бахтеева В.Т., Лаврова Е.А., Парнова Р.Г. Экспрессия индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и ее регуляция в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки при действии липополисахарида *E. coli*. // XXI съезд Физиол. общества им. И.П.Павлова. Калуга. 2010. Тезисы докладов. С. 441.