

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

на правах рукописи

Василий Андреевич Попков

Механизмы влияния беременности на ишемическое повреждение почек

Специальность 03.03.01 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в лаборатории структуры и функции митохондрий Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

Научные руководители:

Плотников Егор Юрьевич, доктор
биологических наук
Зоров Дмитрий Борисович, доктор
биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Андреева Елена Ромуальдовна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, лаборатория клеточной физиологии, ведущий научный сотрудник.

Смирнова Ольга Вячеславовна, доктор биологических наук, профессор, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, заведующая лабораторией эндокринологии.

Ефимов Антон Евгеньевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова, лаборатория бионанотехнологий, ведущий научный сотрудник.

Защита диссертации состоится 8 апреля 2019 года в 17 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.06 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «Истина»: <https://istina.msu.ru/dissertations/157323877/>

Автореферат разослан «7» марта 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы

Острое почечное повреждение (ОПП) – нарушение функции почек, характеризующееся быстрым снижением скорости клубочковой фильтрации, которое сопровождается накоплением продуктов азотистого метаболизма, водно-электролитными и кислотно-щелочными нарушениями (Devarajan, 2005). ОПП является одним из основных факторов смертности во всем мире: данная патология развивается у 20% госпитализированных тяжелых больных, а смертность от нее может достигать 60% (Rewa & Bagshaw, 2014; Schrier, Wang, Poole, & Mitra, 2004).

Беременность, в свою очередь, является значимым фактором, влияющим на патогенез ОПП. Она увеличивает вероятность развития ОПП как осложнения других патологий, например, сепсиса, микроангиопатии, сердечной недостаточности, преэклампсии или послеродового кровотечения. Само ОПП увеличивает вероятность развития многих патологий при беременности, в первую очередь, преэклампсии. Эпидемиология ОПП во время беременности отличается в разных странах и может достигать 10% всех беременностей в развивающихся странах, при этом смертность может достигать 18%. В совокупности ОПП и сопутствующие осложнения являются главными факторами смертности матери и плода и, безусловно, требуют отдельного изучения.

С другой стороны, ряд исследований демонстрирует защищающий эффект беременности для некоторых патологий. Показано, например, что во время беременности усиливается регенерация печени у старых крыс в четыре раза, а также уменьшается постоперационная смертность животных в пять раз (Gielchinsky et al., 2010). Сходные эффекты были также продемонстрированы для регенерации мышц (Falick Michaeli et al., 2015) и повреждения спинного мозга (Gregg et al., 2007).

Наличие таких разнонаправленных эффектов диктует необходимость тщательного исследования как нормальной, так и патологической физиологии почек в условиях беременности, однако на данный момент фундаментальных исследований механизмов влияния беременности на острые почечные патологии крайне мало. Подавляющее количество информации по этой теме получено в клинических условиях, что затрудняет понимание и анализ механизмов описываемых явлений. Это связано с тем, что клинические исследования рассматривают сложную картину, включающую в себя как саму патологию, так и сопутствующие осложнения и терапию.

Цель данной работы – определить влияние беременности на острое ишемическое почечное повреждение и исследовать механизмы этого влияния.

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

1. Провести сравнительный анализ тяжести ОПП после ишемии почки у интактных самок крыс и при беременности;
2. Оценить образование фиброза через 2 месяца после ишемии/реперфузии почки;
3. Исследовать сигнальные пути, влияющие на ишемическую толерантность почки, в норме и при беременности;

4. Исследовать пролиферацию клеток почки беременных и контрольных самок крыс при моделировании ишемии *in vitro*;
5. Проанализировать влияние факторов, связанных с эмбрионом, и гормональных изменений в организме самки при беременности на устойчивость клеток почки к ишемии.

Научная новизна работы

В работе впервые изучены особенности развития ишемического повреждения почек при беременности у экспериментальных животных. Показано, что беременность значительно облегчала острое почечное повреждение, вызванное ишемией/реперфузией почки. Это выражалось в меньшем нарушении выводящей функции почек, которая была оценена с помощью стандартных биохимических маркеров – концентрации креатинина и мочевины в крови. Также было отмечено снижение концентрации в крови беременных животных нового биомаркера острого повреждения почек NGAL, активно внедряемого сейчас в клиническую практику (Shemin & Dworkin, 2011). С помощью гистопатологических методов было показано уменьшение повреждения ткани почки после ишемии/реперфузии у беременных животных: это выражалось в сокращении количества и площади зон острого тубулярного некроза и уменьшении количества гиалиновых цилиндров в просвете канальцев.

Обнаружено, что долгосрочные последствия повреждения, такие как образование фиброза в ткани почки, также значительно менее выражены у беременных животных через 2 месяца после повреждения.

Отмечено, что клетки эпителия почечных канальцев, выделенные из почек беременных животных, демонстрировали значительно лучшую жизнеспособность через 24 часа после повреждающего воздействия кислородно-глюкозной депривации. Показано, что это обеспечивается значительно большей скоростью пролиферации клеток. Кроме того, выявлено увеличение количества белков, ассоциированных с пролиферацией и регенерацией, таких как PCNA, GDF11, VEGF и эритропоэтин в образцах крови и клеток почек, полученных из беременных животных.

Доказано, что увеличение ишемической толерантности почек, по крайней мере частично, обуславливается гормональными изменениями в организме матери, поскольку гормональная псевдобеременность, при которой отсутствует плод, симулировала эффекты настоящей беременности, обеспечивая сходный уровень защиты почек от ишемического повреждения.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты проведенных исследований расширяют представления о механизмах развития ОПП ишемического генеза при беременности. В ходе работы была продемонстрирована большая устойчивость беременных к такому повреждению, исследованы сигнальные каскады, увеличивающие толерантность почки, и обнаружена ключевая роль гуморальных факторов в обеспечении этой толерантности.

Данная работа важна не только для фундаментальной науки, но и для клинической практики в акушерстве и гинекологии, поскольку патологии почек являются одними из самых опасных для здоровья матери и плода. В ходе работы обнаружено, что повреждения почек сами по себе во время беременности являются

менее опасными и, возможно, эта работа позволит скорректировать клинические подходы к терапии беременных, сместив фокус с непосредственно повреждения на различные осложнения. Полученные данные дают возможность предположить, что терапия половыми гормонами может быть использована в качестве нового подхода для лечения почечных патологий, по крайней мере, у женщин.

Методология и методы исследования

В представленной работе для изучения эффектов, оказываемых беременностью на ишемическую толерантность почек, проводились эксперименты на животных, в ходе которых у них микрохирургическим путем вызывалось ишемия и последующая реперфузия почек. Для оценки повреждения почек использовался ряд маркеров, таких как концентрация креатинина и мочевины в крови, широко используемые в клинической практике, а также новые биомаркеры, такие как NGAL. Также последствия повреждения оценивались с использованием гистологических методов. Для исследования механизмов эффектов, оказываемых беременностью, использовались эксперименты на первичной культуре эпителия почечных канальцев, которая исследовалась микроскопически с помощью различных флуоресцентных зондов; в клетках методом вестерн-блоттинга определялось содержание ключевых молекул, ассоциируемых с пролиферацией; а также исследовалась скорость пролиферации с помощью системы наблюдения пролиферации клеток в реальном времени.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Беременность защищает почки крыс от острого ишемического повреждения;
2. Беременность не влияет на уже имеющиеся повреждения и признаки хронической почечной недостаточности;
3. Фиброз после ишемического повреждения, перенесенного во время беременности, менее выражен, чем в случае ишемии почки у интактных самок;
4. Изменения толерантности почки к ишемии/реперфузии связаны с усилением регенеративных возможностей ткани, в частности, с усилением пролиферации;
5. Повышение устойчивости почки при беременности обуславливается, в первую очередь, гормональными изменениями в организме матери, а не факторами, продуцируемыми плодом.

Степень достоверности данных

Данные, представленные в работе, получены с использованием современных экспериментальных методик. Представленные в работе результаты статистически достоверны и воспроизводимы. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальной литературы.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ: 7 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ и индексируемых в базах данных Web of Science или Scopus, и 4 тезиса докладов на российских и международных конференциях.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на международных конференциях: 43rd FEBS Congress (Чехия, Прага, 2018), 19-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, Россия, 2015), 54th ERA-EDTA Congress (Мадрид, Испания, 2017) и V Съезде физиологов СНГ (Сочи, Россия, 2016).

Диссертационная работа апробирована 17 сентября 2018 года на заседании отдела функциональной биохимии биополимеров НИИ ФХБ им. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова и 22 октября 2018 года на заседании кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Личный вклад автора

Соискатель лично принимал участие во всех этапах работы: планировании и проведении экспериментов, статистической обработке и обобщении результатов, написании статей и тезисов, представлении результатов работы на российских и международных конференциях.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 125 страницах, содержит 4 таблицы и 34 рисунка и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список литературы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание, уход за животными и забор образцов. Эксперименты были выполнены на беспородных самках крыс (250–400 г), содержащихся в условиях вивария и получавших стандартный рацион питания. Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с Правилами лабораторной практики, определенными Приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. N 708н г. Москва. На проведение экспериментального исследования было получено разрешение Комиссии по биоэтике НИИ Физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского. Для получения беременных крыс отобранных самок ссаживали в клетку с самцами на 2 дня. Затем самцы удалялись из клетки. На 18 сутки забеременевшие крысы отбирались для эксперимента. Такой подход позволяет достаточно точно установить срок беременности по дате возможного зачатия. Псевдобеременность индуцировали по следующему протоколу: девственным крысам инъецировали человеческий хорионический гонадотропин (10 единиц на кг) дважды с интервалом 48 часов, после второй инъекции их ссаживали для спаривания с вазэктомированными самцами. Псевдобеременные животные брались на 7-й день после первой инъекции гонадотропина. Забор крови во всех экспериментах осуществляли из хвостовой вены. В сыворотке крови анализировали концентрации креатинина и мочевины с помощью автоматического анализатора AU480 Chemistry System (Beckman Coulter, США). Сбор суточной мочи проводился с помощью специальных обменных клеток. Собранную мочу анализировали на автоматическом анализаторе AU480 Chemistry System (Beckman Coulter, США) и с помощью вестерн-блоттинга.

Моделирование ишемии/реперфузии почки *in vivo*. Для моделирования ОПП проводили унилатеральную ишемию/реперфузию (И/Р) с одновременной правосторонней нефрэктомией. Крыс наркотизировали хлоралгидратом (300 мг/кг внутривентрально). Животное фиксировали на подогреваемом столике, выполняли разрез брюшной стенки, сосудистый пучок левой почки освобождали от прилежащей жировой ткани, после чего пережимали на 40 минут микрососудистым зажимом. Отсутствие кровотока оценивали визуально по изменению цвета почки. Затем циркуляцию крови возобновляли, удаляя зажим. Правую почку удаляли, на операционный разрез накладывали швы. Во всех экспериментах в течение всего времени действия наркоза температура животного поддерживалась на уровне 36,8-37,0°C. В первый день после И/Р почки забирали и фиксировали 10% нейтральным формалином для гистологического анализа. На второй день после И/Р брали образцы крови и почки для выделения митохондрий, определения концентрации малонового диальдегида (МДА) в ткани, вестерн-блоттинга. Для проведения вестерн-блоттинга ткани почек гомогенизировали при 4°C гомогенизатором Поттера стекло-тефлон в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF). У части крыс почки забирали через два месяца после И/Р для анализа образования фиброза.

Конфокальная микроскопия. Была использована методика получения витальных срезов почечной ткани и микроскопического изучения физиологических реакций клеток почки после окраски флуоресцентными зондами. После И/Р почку выделяли и помещали в среду инкубации (стандартный раствор Хенкса 10 мМ HEPES-NaOH pH 7,4) для отмывки. Затем с помощью вибрационного микротомы Vibratom NLS (WPI, США) делали срезы корковой зоны толщиной 100 мкм. Срезы промывали средой инкубации и оставляли в ней для дальнейшего окрашивания флуоресцентными красителями. Все манипуляции и инкубация срезов проводились при температуре 25°C. Микроскопическое изучение витальных срезов почки производилось на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM510 (Carl Zeiss, Германия) с фирменным программным обеспечением. Для возбуждения флуоресценции использовались аргонный лазер (полоса излучения 488 нм) и HeNe лазер (полоса излучения 543 нм), флуоресцентное излучение проходило через систему стандартных запирающих фильтров. Скорость сканирования, уровень усиления сигнала и разрешение получаемого изображения были одинаковы для всех экспериментов каждой серии. Толщина конфокальной плоскости составляла 1,5 мкм.

Оценка продукции активных форм кислорода и митохондриального потенциала. Образование активных форм кислорода детектировали с помощью 2,7-дихлорфлуоресцеина (Invitrogen, США) в виде мембран-проникающего диацетатного эфира (2,7-DCF DA). Полученные по описанной методике срезы инкубировали в течение 10 мин при 25°C в среде инкубации, содержащей 10 мМ 2,7-DCF DA. Затем срезы отмывали чистой средой инкубации в течение 5 мин и помещали в пластиковую чашку Петри со стеклянной вставкой в дне. Для оценки трансмембранного потенциала митохондрий срезы инкубировали в течение 10 мин с этиловым эфиром тетраметилродамина (TMRE, 200 нМ). Флуоресценцию зондов детектировали с помощью конфокального микроскопа, как описано выше.

Определение концентрации МДА. Концентрацию МДА в гомогенате почки определяли по методике с использованием тиобарбитуровой кислоты.

Определение эритропоэтина в моче. Крыс помещали в метаболические клетки для сбора мочи в течение 24 часов. Собранную мочу фильтровали и концентрировали с помощью центрифугирования в ультрафильтрационных концентраторах Amicon Ultra-4, 10 кДа (Millipore, США). В полученных образцах анализировали концентрацию эритропоэтина с помощью набора для иммуноферментного анализа ELISA Quantikine® в соответствии с инструкциями производителя (R & D Systems, США).

Гистология почек. Почку извлекали и фиксировали в 10%-ном нейтральном растворе формалина и заливали в парафин. Получали срезы толщиной 5 мкм, депарафинировали, гидратировали и окрашивали гематоксилин-эозином или пикрофуксином. Срезы исследовали на острый тубулярный некроз, фиброз и другие патологические изменения. Для измерения фиброза процент положительно окрашенных на соединительную ткань участков оценивался с использованием плагина «Color threshold» программы Fiji. Цветовой порог настраивали вручную для каждого изображения. Подсчитывали площадь среза, занятую фиброзом. Было исследовано не менее семи полей зрения для каждого среза.

Эксперименты на первичной культуре клеток почечного эпителия. У взрослых крыс асептически удаляли почки, измельчали и диссоциировали с помощью 0,1% раствора коллагеназы. Дифференциальным центрифугированием получали отдельные почечные каналы. Суспензию ресуспендировали в среде, содержащей DMEM/F12 с 10%-ной эмбриональной бычьей сывороткой и EGF (10 нг/мл) и культивировали в пластиковых флаконах или 96-луночных планшетах. Ишемию моделировали путем кислородно-глюкозной депривации (КГД): среду заменяли на DPBS (забуференный фосфатом физиологический раствор Дульбекко), а кислород – на N₂ в мультигазовом инкубаторе Galaxy 170R (Eppendorf/NewBrunswick, UK). После КГД среду заменяли на описанную выше культуральную среду и нормальную концентрацию O₂. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью стандартного теста с метил-тиазолтетразолием (MTT). Клетки в 96-луночных планшетах инкубировали с MTT (2 мг / мл в DMEM / F12) в течение 120 мин при 37°C. Затем удаляли раствор красителя, добавляли 50 мкл диметилсульфоксида на лунку и измеряли оптическую плотность при 595 нм с помощью планшетного спектрофотометра Zenyth (Anthos Labtec, Австрия).

Мониторинг пролиферации клеток в реальном времени. Анализ кинетики роста клеток проводили с использованием прибора RTCA iCELLigence™ (ACEA, США). Метод основан на использовании электрического сопротивления электродов, покрытых клетками. Инструмент iCELLigence RTCA помещали в инкубатор при 37°C и 5% CO₂. Клетки почечных канальцев высевали на 8-луночные планшеты с микроэлектродами. Через 48 часов клетки подвергали воздействию 17-часовой КГД как описано выше.

Вестерн-блоттинг. После извлечения почки быстро охлаждали в ФСБ, удаляли почечную лоханку и капсулу, почку измельчали на фрагменты и гомогенизировали в четырехкратном объеме ФСБ, содержащем 1 мМ ингибитора протеаз PMSF. Полученный гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин в течение 3 минут, супернатант смешивали с четырехкратным буфером для образцов, содержащем 0,125 М Трис-HCl (pH 6,8), 4% додецилсульфата натрия, 20% глицерина, 0,005% бромфенола синего и 10% 2-меркаптоэтанола, в соотношении 3:1, прогревали в течение 5 минут при 99°C, а затем замораживали. Полученные образцы анализировали с помощью вестерн-блоттинга. Первичные антитела против PCNA использовали в разведении 1:1000 (ab13110, Cell Signaling, США), GDF11 – 1:500 (ab124721, Abcam, США), NGAL (липокалин 2) – 1:1000 (ab63929, Abcam, США), pGSK3β – 1:700 (9336, Cell Signaling, США), GSK3 α/β – 1:1000 (sc7291, Santa Cruz Biotech, США), VEGF – 1:1000 (07 -1376, Millipore, США). Вторичные антитела против первичных антител кролика или мыши (P-GAR или P-GAM, ИМТЕК, Россия) использовали в разведении 1:10000. Полосы детектировали с помощью хемилюминесцентного субстрата пероксидазы хрена Advansta Western Bright ECL (Enhanced chemiluminescence, Advansta, США).

Оценка количества карбонилированных белков. При окислении белков образуются карбонильные группы, по количеству которых можно судить о степени модификации белков и общем окислительном стрессе в клетке. Уровень карбонилирования белков определялся с

помощью коммерческого набора Oxyblot™ (Millipore, США). Для этого 5 мкл образца смешивали с 5 мкл 12%-ого додецилсульфата натрия для денатурации белков, а затем инкубировали с 10 мкл раствора DNPH (2,4-динитрофенилгидразин), который сшивается с карбонильными группами в виде DNP-гидразона, в течение 15 минут. Дальнейший протокол работы совпадал с проведением вестерн-блоттинга, использовались коммерческие первичные антитела из набора на DNP-остатки на белках.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили в программе Microsoft Excel. Для оценки изменения параметров во времени использовался парный непараметрический критерий Вилкоксона. Для сравнения несвязанных данных (разных групп крыс или при обработке данных, полученных на конфокальном микроскопе) использовался непараметрический U-критерий Манна-Уитни. По результатам анализа данных было принято решение не использовать t-критерий Стьюдента и дисперсионный анализ (Anova) ввиду малых выборок или ненормальности данных (проверенных с помощью критерия Шапиро-Уилка). При необходимости множественных сравнений использовалась поправка Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ

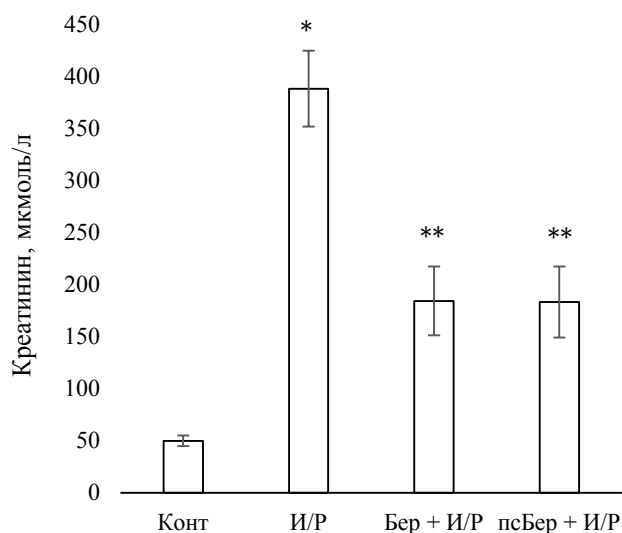


Рисунок 1. Дисфункция почек через 48 часов после И/Р, оцененная по повышению концентрации креатинина в плазме крови (мкмоль/л) у небеременных (И/Р, n=10), беременных (Беременность + И/Р, n= 10) и псевдобеременных (Псевдобеременность + И/Р, n=8) животных, подвергшихся И/Р почки. В качестве контроля (Контроль, n=10) использованы ложнооперированные животные. *p <0.05 по сравнению с контролем, **p <0.05 по сравнению с И/Р

Острое почечное повреждение при ишемии у беременных и контрольных самок

Концентрация креатинина в крови у небеременных животных через 48 часов после И/Р увеличивалась в четыре раза и достигала 388 ± 36 мкМ (Рис.1) по сравнению со значениями в крови контрольных животных 50 ± 4 мкМ. Аналогичные результаты демонстрирует и второй клинический маркер функции почек – концентрация мочевины в сыворотке крови: И/Р вызывает шестикратное увеличение концентрации мочевины в крови (с 10 ± 1 до 60 ± 6 мМ). Поскольку мочевины и креатинин являются продуктами азотистого обмена, выводимыми почками, повышение их концентрации в крови говорит о том, что после И/Р функция почек нарушена, и их выведение не обеспечивается в должной мере. После И/Р у групп беременных и псевдобеременных крыс почечная

недостаточность была менее выражена: концентрация креатинина в крови снижалась до 184 ± 33 и 183 ± 34 мМ, соответственно, а мочевины до 37 ± 5 и 43 ± 10 мМ, соответственно. Это свидетельствует о том, что беременность и псевдобеременность защищают почки от последствий острого ишемического почечного повреждения.

Для оценки повреждения ткани почек использовали новый маркер, который начинает активно внедряться в клиническую практику – NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов). Повышение NGAL отражает ОПП на ранних стадиях его возникновения, даже если почечная дисфункция еще не проявляется. Через 48 часов после моделирования ишемии почки в плазме крови небеременных животных наблюдалось семикратное увеличение концентрации NGAL по сравнению с интактными животными (Рис.2). У беременных животных, перенесших И/Р, концентрация NGAL в крови была снижена на 40% по сравнению с И/Р почки у небеременных крыс, что говорит о снижении ОПП на фоне беременности.

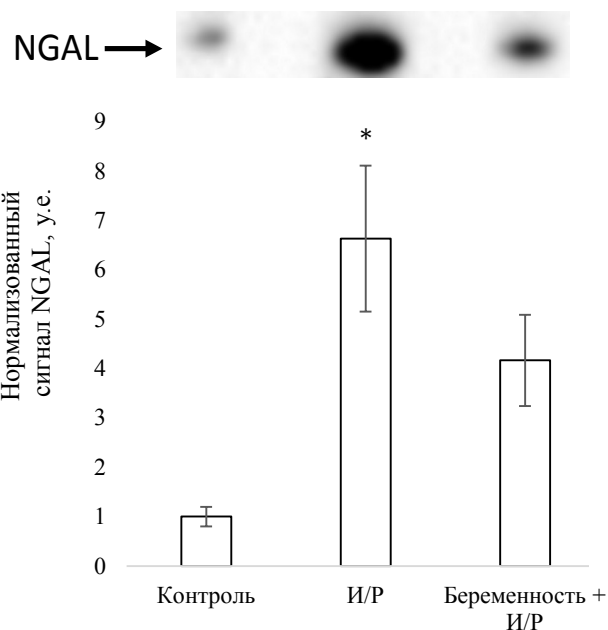


Рисунок 2. Структурные повреждения почек через 48 часов после ОПП, оцененные по повышению концентрации маркера повреждения NGAL в плазме крови у небеременных (И/Р, n= 6) и беременных (Беременность + И/Р, n=3) животных, подвергшихся И/Р, по сравнению с контрольными животными (Контроль, n=2), *p < 0.05 по сравнению с контролем.

Влияние беременности на патоморфологические изменения после ишемии почки

Для прямой оценки повреждения тканей почек после И/Р были проведены гистологические исследования. Острый тубулярный некроз – наиболее значимый патологический процесс, происходящий при ОПП. В корковой зоне почек небеременных животных через 24 часа после И/Р наблюдается выраженный канальцевый некроз (Рис.3), причем зоны некротизированных канальцев занимают большую площадь. Кроме того, наблюдается множество канальцев с десквамированным эпителием, а также канальцы с эпителием в состоянии гидропической дистрофии. Многие канальцы дилатированы, что говорит о возможной обструкции нижележащих сегментов нефрона и ухудшении тока первичной мочи. Это подтверждается наличием многочисленных гиалиновых цилиндров в просвете канальцев. В группе беременных животных после И/Р ткань почки была значительно менее повреждена: наблюдались лишь редкие очаги некроза, отдельные слущенные клетки в просвете канальцев. Патологические изменения были представлены в основном только канальцами с десквамированным эпителием, а также эпителием в состоянии дистрофии. Дилатированные канальцы и гиалиновые цилиндры встречались значительно реже, чем у небеременных животных после И/Р, что позволяет сделать вывод, что обструкция нижних отделов нефрона и собирательных трубочек менее

выражена. Таким образом, беременность снижает выраженность гистопатологических изменений ткани почек в острой фазе повреждения.

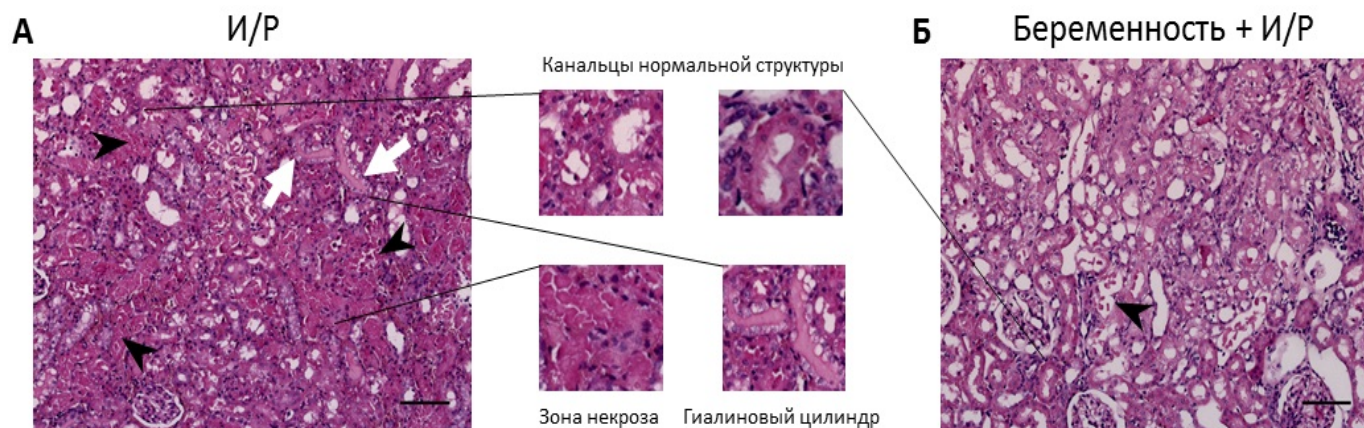


Рисунок 3. Острый тубулярный некроз через 24 часа после И/Р почки. Тубулярный некроз (черные стрелки) и гиалиновые цилиндры (белые стрелки) в почке небеременных (А, И/Р) и беременных (Б, Беременность + И/Р) животных после И/Р. Шкала 100 мкм.

Влияние беременности на фиброз после ишемии почки

Для оценки долгосрочных последствий ОПП было проведено исследование фиброзных изменений через 2 месяца после И/Р. Формирование фиброза было оценено по наличию специфически окрашенных участков ткани: коллагеновые и ретикулярные волокна при использованной методике окрашиваются в сине-фиолетовый цвет. Исследовалась преимущественно корковая зона почки. Было выявлено, что площадь, занимаемая соединительной тканью у небеременных животных, перенесших И/Р, в среднем составляет 20% от всей площади среза, а в отдельных зонах занимает до 30% (Рис.4). У животных, которые на момент И/Р находились в третьем триместре беременности, средняя площадь, занимаемая рубцовой тканью, составляла 7% от площади среза. Таким образом, меньше функциональной ткани было заменено на соединительную ткань, которая не только не выполняет функции, но также препятствует адекватному кровоснабжению окружающей почечной ткани и нарушает общую структуру органа. Сходные результаты получены при исследовании образования фиброза у животных, находившихся на момент ишемии почки в состоянии гормональной псевдобеременности. Хотя изменения в этом случае были чуть менее выраженными: в среднем 12% ткани было занято соединительной тканью, что в полтора раза меньше, чем у небеременных животных, перенесших И/Р. Необходимо отметить, что в долгосрочной перспективе именно пост-ишемическое образование фиброза в почке приводит к нарушению ее функций, а значит отдаленные функциональные последствия повреждения почек, перенесенного при беременности или псевдобеременности, будут гораздо менее выражены, чем у небеременных животных. Подобные отличия могут свидетельствовать как о различиях в тяжести изначального повреждения, так и о разной интенсивности регенерации и вторичного повреждения после И/Р.

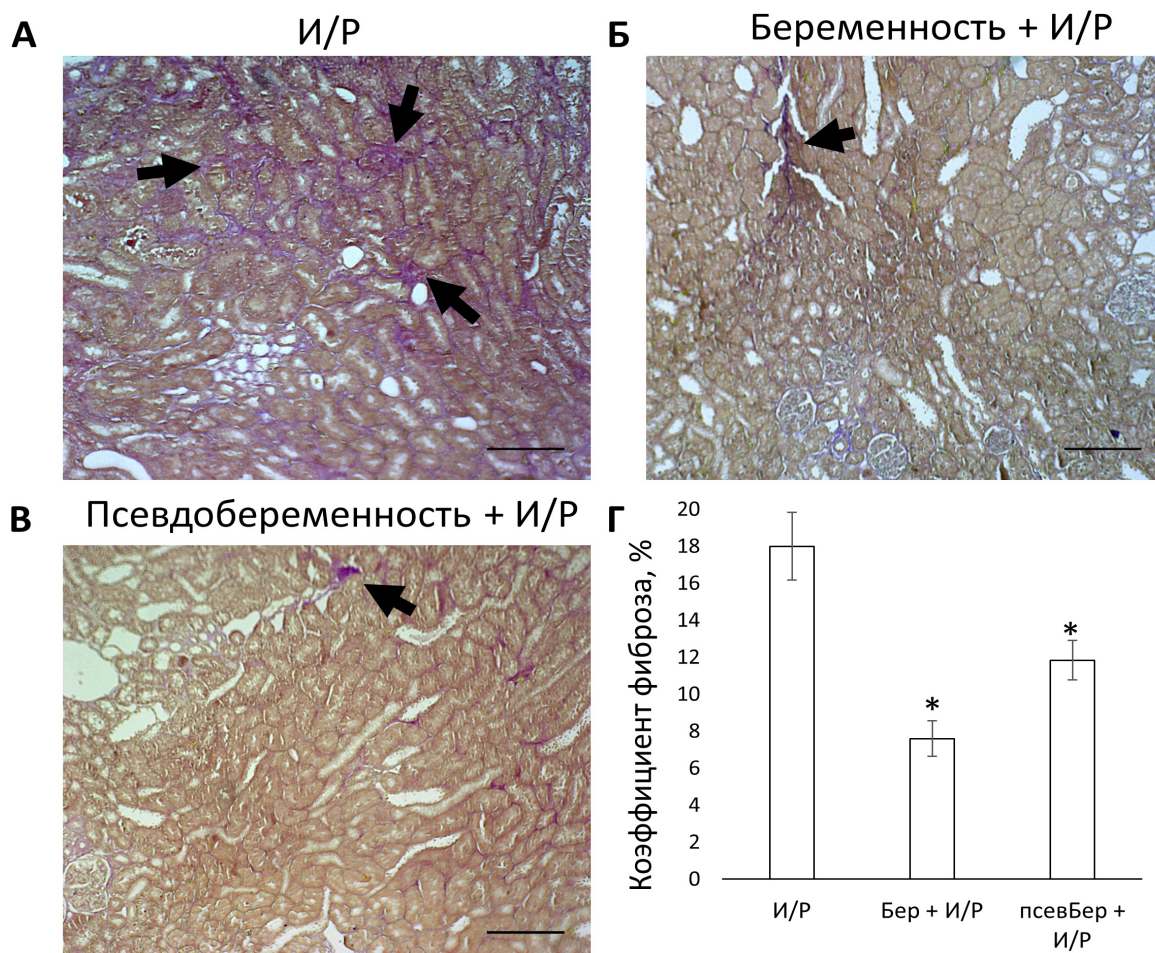


Рисунок 4. Фиброз в тканях почек через 2 месяца после ОПП. Репрезентативные изображения фиброза в тканях небеременных (А), беременных (Б) и псевдобеременных (В) животных, перенесших И/Р и (Г) коэффициент фиброза, посчитанный по всем изображениям. Шкала 100 мкм. * $p < 0.05$ по сравнению с И/Р.

Влияние беременности, возникшей после ОПП, на функционирование почек

Также было исследовано, влияет ли возникновение беременности на уже имеющуюся почечную недостаточность. Для этого сравнивались интактные беременные и небеременные самки с животными, подвергшимися ишемическому повреждению почки за два месяца до беременности. Исходя из биохимического анализа крови и мочи состояние крыс через два месяца после И/Р можно характеризовать как компенсированную хроническую болезнь почек (ХБП). На фоне такого состояния самок крыс ссаживали с самцами до возникновения беременности.

Выявлено, что перенесенная И/Р почки приводит через два месяца к выраженной полиурии, то есть увеличению суточного объема мочи (Рис.5): у животных через два месяца после И/Р суточный объем мочи увеличился в четыре раза с 10 мл до 40 мл в сутки. Это говорит об уменьшении реабсорбции воды в почечных канальцах из-за повреждения. Однако беременность значительно не повлияла на данный параметр. Суточное выделение белка – параметр, отражающий сохранность барьерной функции гломерулярного аппарата. У крыс через два месяца после И/Р небольшие изменения

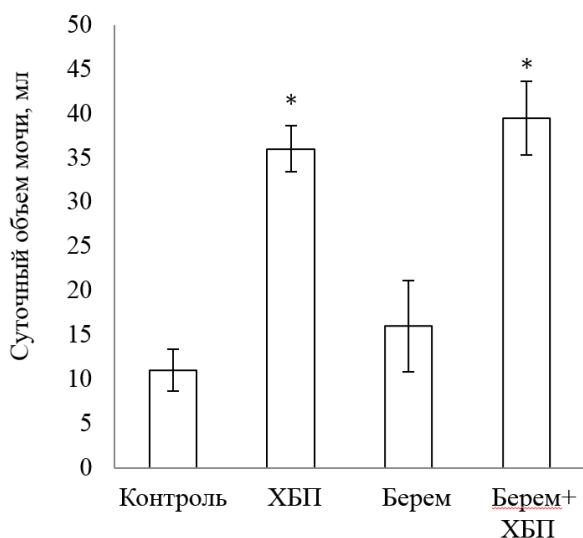


Рисунок 5. Суточный объем мочи крыс с хронической почечной недостаточностью у небеременных (ХБП, n=3) и беременных (Берем + ХБП, n=3) крыс, а также у интактных небеременных (Контроль, n=3) и беременных (Берем, n=3) животных. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем и беременностью.

повышение содержания креатинина в крови у небеременных самок (60 мкМ по сравнению с 40 мкМ у интактных животных). Наступление беременности значимо не повлияло на концентрацию креатинина в крови у обеих групп крыс. Оценка концентрации креатинина в моче крыс через два месяца после повреждения не выявила достоверных изменений в сравнении с интактным контролем ни в одной из групп.

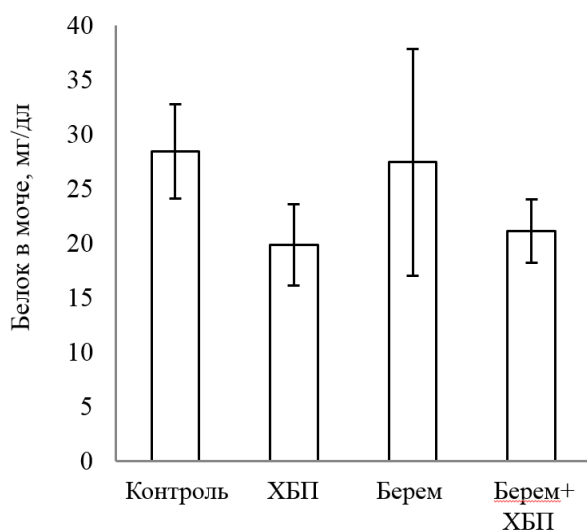


Рисунок 6. Уровень белка в моче крыс с хронической почечной недостаточностью у небеременных (ХБП, n=3) и беременных (Берем + ХБП, n=3) крыс, а также у интактных небеременных (Контроль, n=3) и беременных (Берем, n=3) животных.

концентрации белка в моче (Рис.6) и объема мочи (Рис.5) приводили тем не менее к заметной протеинурии (Рис.7). Суточное выделение белка было повышено в два раза, с 3 до 6 мг. Беременность на данный параметр не повлияла. Таким образом, состояние почек у крыс через два месяца после И/Р можно охарактеризовать как первую стадию ХБП (стадия компенсации).

Уровень мочевины в крови у крыс, перенесших И/Р почки с правосторонней нефрэктомией, через два месяца после операции был незначительно выше (12 мМ), чем у интактных крыс (7 мМ). Возникновение беременности не повлияло на концентрацию мочевины в крови как у интактных животных, так и у животных, подвергшихся И/Р. Сходным образом, перенесенная за два месяца до забора образцов И/Р вызвала незначительное

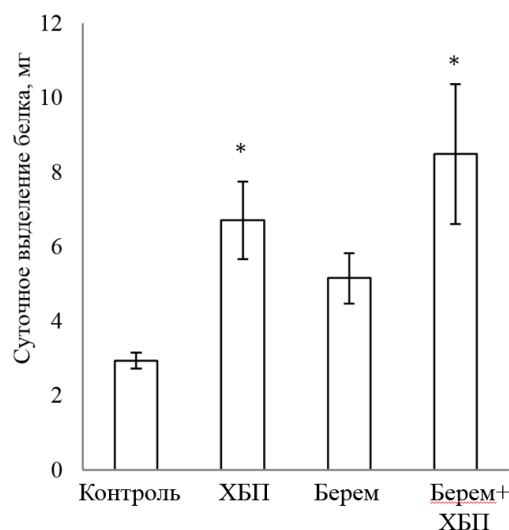


Рисунок 7. Суточное выделение белка у крыс с хронической почечной недостаточностью у небеременных (ХБП, n=3) и беременных (Берем + ХБП, n=3) крыс, и у интактных небеременных (Контроль) и беременных (Берем, n=3) животных. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

По итогам анализа полученных результатов можно заключить, что через два месяца после И/Р почки наблюдаются полиурия и повышение суточного выделения белка, что, по-видимому, вызывается нарушением гломерулярной фильтрации и ухудшением реабсорбции воды в нефроне. Это указывает на начало развития скомпенсированной ХБП, поскольку значимого повышения концентрации креатинина и мочевины в крови не наблюдалось. Беременность на фоне ХБП не вызвала значимых изменений, из чего можно сделать вывод, что на уже поврежденную почку, в которой в основном завершились как повреждающие, так и регенеративные процессы, значимого влияния беременность не оказывает.

Эффекты кислородно-глюкозной депривации на клетки почки беременных и контрольных животных

Анализ влияния беременности на клеточном уровне проводился на первичной культуре эпителия почечных канальцев небеременных, беременных и псевдобеременных животных. Для доказательства фенотипа клеток, первичная культура была окрашена антителами к специфическому белку Тамма-Хорсфалла, характерного для эпителия почечных канальцев, что подтвердило чистоту получаемых канальцевых клеток.

При моделировании КГД (ишемии *in vitro*) не было обнаружено значимого различия в выживаемости между культурами клеток, выделенными из почек беременных и небеременных животных, через час после КГД (Рис.8, В). Жизнеспособность клеток почки в обеих группах составляла 35% от контрольных клеток, не подвергшихся КГД. Через 24 часа после КГД жизнеспособность клеток, полученных из почек беременных самок, была в 1,3 раза выше, чем у клеток из почек небеременных животных, и составляла 65% по сравнению с контролем. Кроме того, через 24 часа после КГД была измерена площадь клеток для оценки гипертрофии почечных клеток, поскольку известно, что беременность может влиять на этот параметр в других органах. Было обнаружено, что размеры клеток значимо не отличались между культурами, выделенными из почек небеременных и беременных животных, и КГД также значимо не повлияла на площадь клеток (Рис.8, Б).

Для исследования вклада пролиферации в наблюдаемое повышение толерантности клеток почки к ишемии был проведен мониторинг деления клеток почечных канальцев в реальном времени. С его помощью были получены кривые роста и гибели клеточных культур на протяжении нескольких суток: от момента выделения из органа до 24 часов после окончания КГД. Для оценки скоростей роста и гибели культуры была вычислена производная клеточного индекса, регистрируемого прибором. Различий в скорости роста в период до КГД (фаза I) между клетками канальцев, выделенных из небеременных, беременных и псевдобеременных животных, не обнаружено (Рис.9, А), о чем говорит отсутствие значимых различий в среднем значении скорости роста клеток на этом отрезке (Рис.9, Б). Также не было обнаружено различий в скорости гибели клеток во время КГД, о чем можно судить по сходному углу наклона кривых клеточного индекса в II фазу (Рис.9, А) и по отсутствию значимых различий в среднем значении скорости гибели клеток на этом отрезке (Рис.9, В). Во время фазы восстановления после КГД в культурах, полученных от беременных и псевдобеременных животных, наблюдалась более высокая скорость пролиферации

клеток, в среднем в 3,5 раза превышавшая скорость роста клеток, полученных от небеременных животных (Рис.9, А, Г). Это говорит о потенциально большей способности к пролиферации клеток почек беременных после ишемического повреждения. Эти данные согласуются с описанными выше результатами теста жизнеспособности клеток.

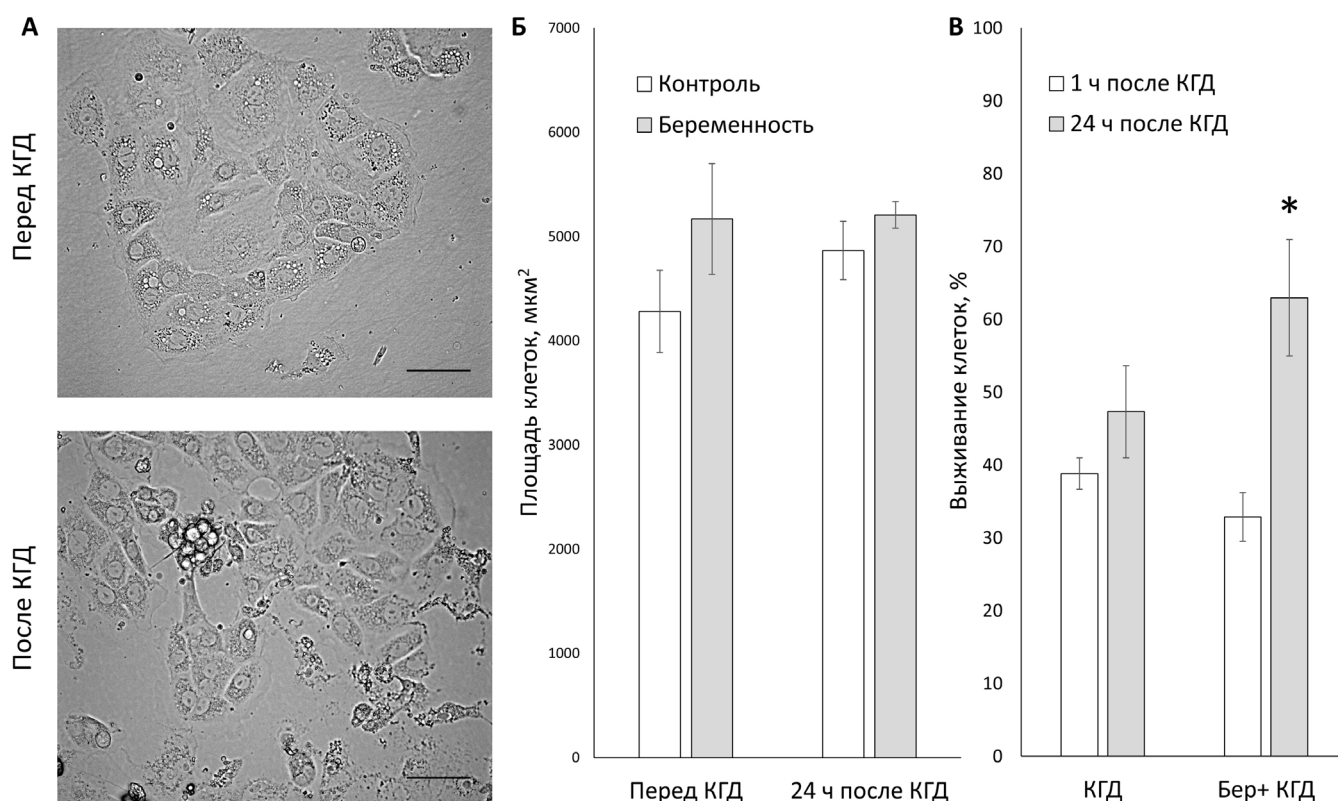


Рисунок 8. Выживание и морфология клеток первичной культуры эпителия почечных канальцев после КГД. (А) Фазово-контрастная микроскопия первичной культуры эпителия почечных канальцев до и после КГД, шкала 100 $\mu\text{м}$. (Б) Размер клеток в культуре до и после КГД и (В) выживание клеток через 1 час и через 24 часа после в контроле (КГД) и при беременности (Бер + КГД). * $p < 0.05$

Влияние беременности на сигнальные пути регенерации и ишемической толерантности почки

Для исследования механизмов повышенной толерантности к ишемии и регенеративного потенциала почки на фоне беременности был проанализирован ряд клеточных маркеров, ассоциируемых с пролиферацией и регенерацией (Рис.10). Уровень одного из классических маркеров пролиферации клеток PCNA был почти вдвое выше в образцах тканей почек беременных крыс (Рис.10, А). Аналогично, более высокий уровень PCNA наблюдался в первичной культуре эпителия почечных канальцев, полученных из почек беременных животных, по сравнению с культурой, выделенной из почек интактных самок (Рис.10, А). Таким образом, можно заключить, что эпителий почки беременных крыс пролиферирует более активно, чем у контрольных самок.

Аналогичная тенденция наблюдалась и с другими молекулами, ассоциируемыми с регенерацией после повреждений. Уровень маркера регенерации GDF11,

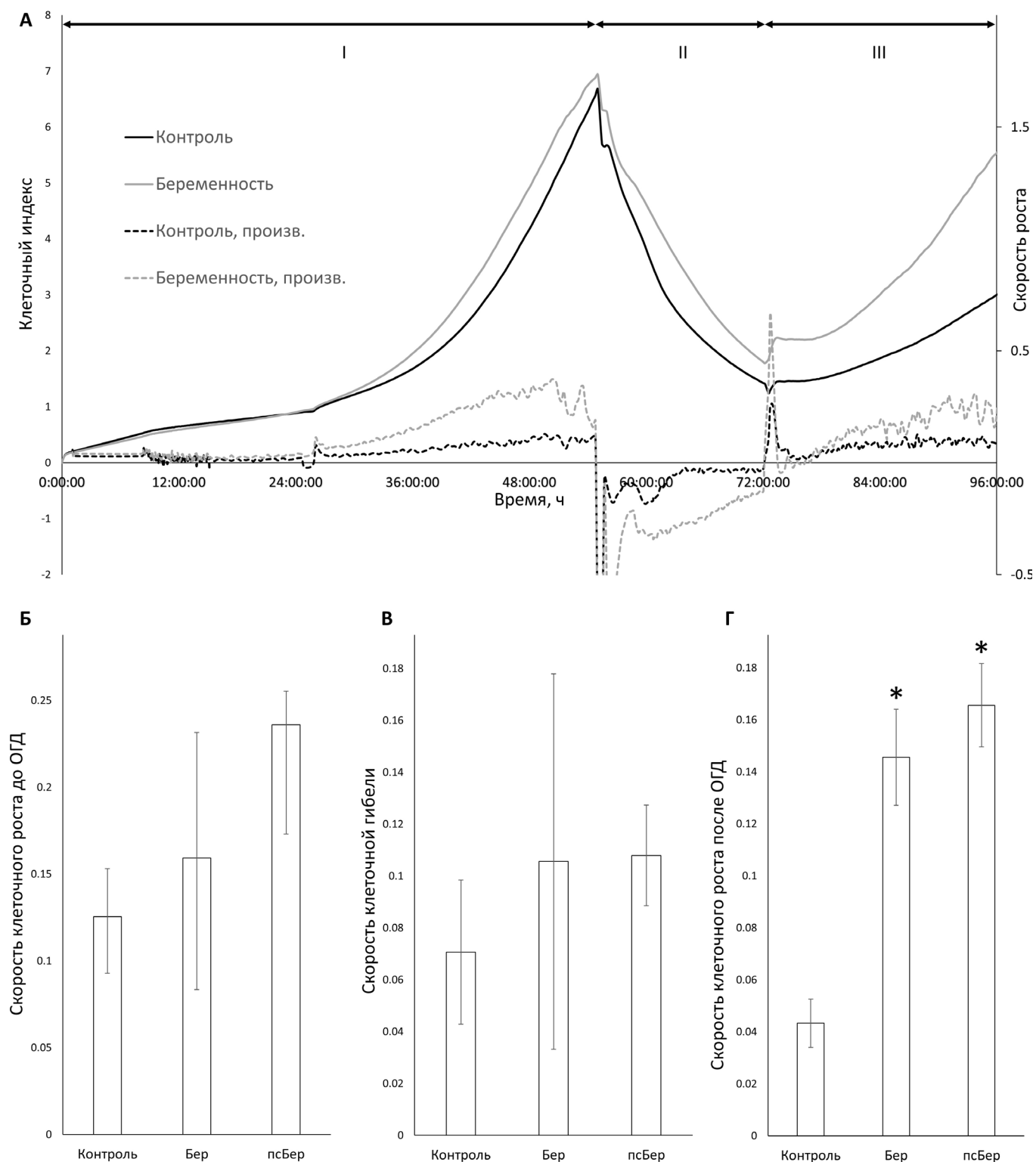


Рисунок 9. Гибель и пролиферация первичной культуры клеток эпителия почечных канальцев, оцененная в режиме реального времени до и после КГД. (А) Пролиферация и скорость роста клеток, полученных из почек небеременных (Контроль) и беременных животных (Беременность) в реальном времени: I, фаза нормоксии; II фаза КГД; III рост при нормальной концентрации кислорода и глюкозы. Сплошной линией отражен клеточный индекс, пунктирной – скорость роста клеток. (Б) Скорость роста до КГД (фаза I), (В) скорость гибели во время КГД (фаза II), и (Г) скорость роста клеток после КГД (фаза III), полученных из почек небеременных (Контроль, n=8), беременных (Бер, n=8) и псевдобеременных (псБер, n=3) животных. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

рассматриваемого иногда как фактор омоложения ткани, был повышен в крови беременных крыс почти в три раза по сравнению с контрольными животными (Рис.10, В). Повышенная продукция GDF11 наблюдалась также в культуре клеток почечного эпителия *in vitro* (Рис.10, В). Фактор роста сосудов VEGF был вдвое выше в ткани почки беременных крыс (Рис.10, Г), что говорит о возможном усилении ангиогенеза и повышении снабжения ткани кислородом и питательными веществами. Уровень эритропоэтина, гормона, обладающего помимо влияния на эритропоэз цитопротекторным действием, был повышен в три раза в моче беременных крыс, что говорит о его высокой продукции почками этих животных (Рис.10, Б). Наконец, в моче беременных самок заметно выше концентрация релаксина, белка, который в ряде работ также ассоциируют с повышенной устойчивостью к повреждениям. В совокупности именно эти факторы могут обуславливать повышенный регенеративный потенциал почек беременных животных и обеспечивать их толерантность к ишемическому повреждению.

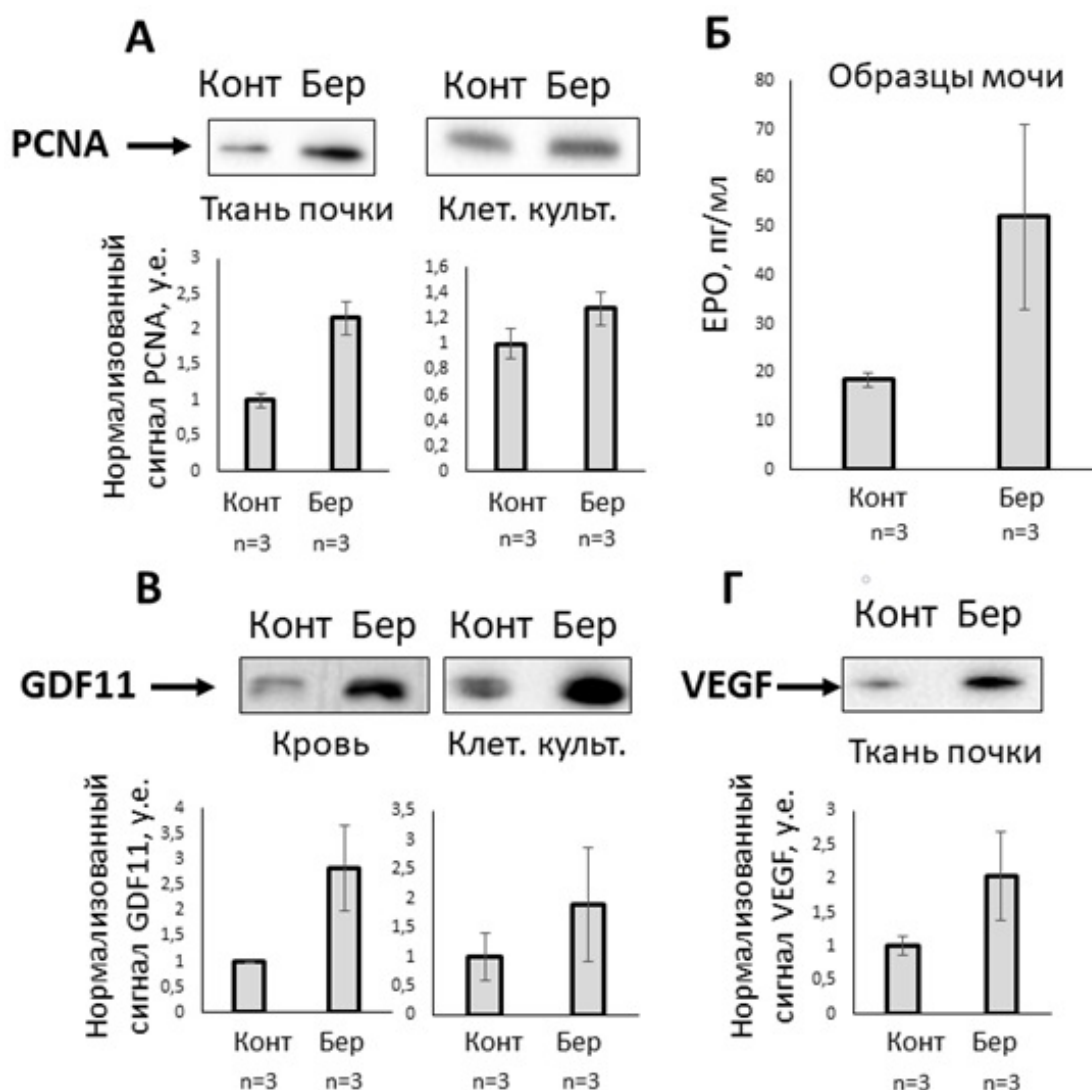


Рисунок 10. Регенеративные маркеры в почках и в крови. Уровень экспрессии (А) PCNA, (Б) эритропоэтина (EPO), (В) GDF11, (Г) VEGF в ткани почки и в первичной клеточной культуре эпителия почечных канальцев беременных и небеременных животных.

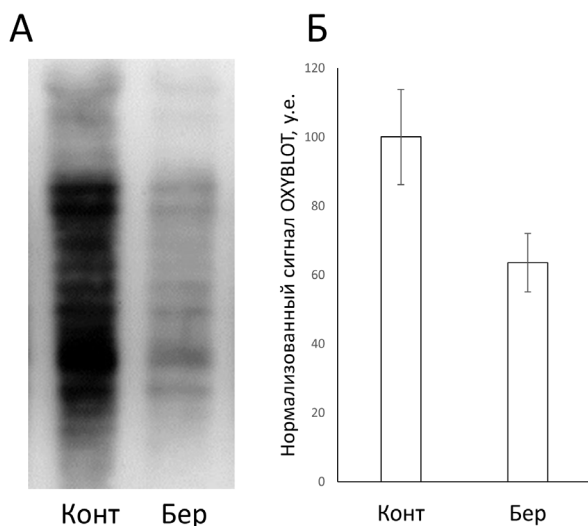


Рисунок 11. Оценка количества карбонилированных белков клетки с помощью метода OxyBlot® в почках контрольных (Конт, n=3) и беременных (Бер, n=3) животных.

значимо не отличался. Это согласуется с другими данными по функционированию почек, демонстрирующих, что беременность на фоне уже имеющихся повреждений не оказывала заметного эффекта на почки.

Также в ткани почки была проанализирована концентрация МДА, продукта перекисного окисления липидов клеточных мембран, которая отражает уровень окислительного повреждения во время реоксигенации. Было показано, что после И/Р количество МДА в почке небеременных животных увеличивалось в четыре раза, в то время как после И/Р почки на фоне беременности концентрация МДА возрастала на 20% меньше (Рис.12). Это служит еще одним свидетельством того, что беременность снижает окислительный стресс во время И/Р.

Для выяснения роли митохондрий и продукции ими АФК в окислительном стрессе после И/Р и влиянии на него беременности была проведена серия опытов на витальных срезах почки с использованием конфокальной микроскопии и флуоресцентных зондов.

С помощью зонда DCF, флуоресценция которого зависит от концентрации перекиси водорода в ткани, было выявлено, что генерация АФК в ткани интактных почек беременных животных ниже, чем у небеременных интактных

Влияние беременности на функционирование митохондрий и окислительный стресс при ишемии почки

С помощью метода Oxyblot было оценено количество карбонилированных белков в ткани почки – продукта окислительных модификаций белков (Рис.11). Этот параметр служит косвенным маркером уровня генерации АФК и окислительного стресса. Обнаружено, что в ткани беременных животных уровень карбонилирования белков на 40% ниже, чем у небеременных животных (Рис.11). Уровень карбонилирования белков у беременных и небеременных животных, перенесших И/Р за два месяца до взятия образцов,

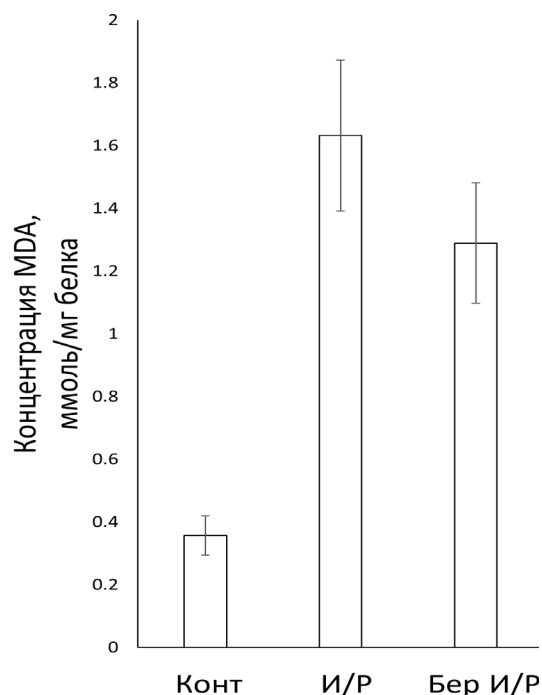


Рисунок 12. Концентрация МДА в ткани почек контрольных (Конт, n=5), а также небеременных (И/Р, n=5) и беременных (Бер И/Р, n=4) животных после И/Р. *p < 0.05 по сравнению с контролем.

животных на 25% (Рис.13, А и Б). Однако, если ткань была подвергнута И/Р, то у беременных животных флуоресценция DCF возрастает более чем в 2 раза по сравнению с тканью почки интактной беременной самки (Рис.13, Б и Г), тогда как у небеременных животных И/Р приводит к усилению флуоресценции DCF на 40% (Рис.13, А и В). Флуоресценция DCF в ткани беременного животного после И/Р превосходила значения после И/Р у небеременных животных на 30% (Рис.13, Д).

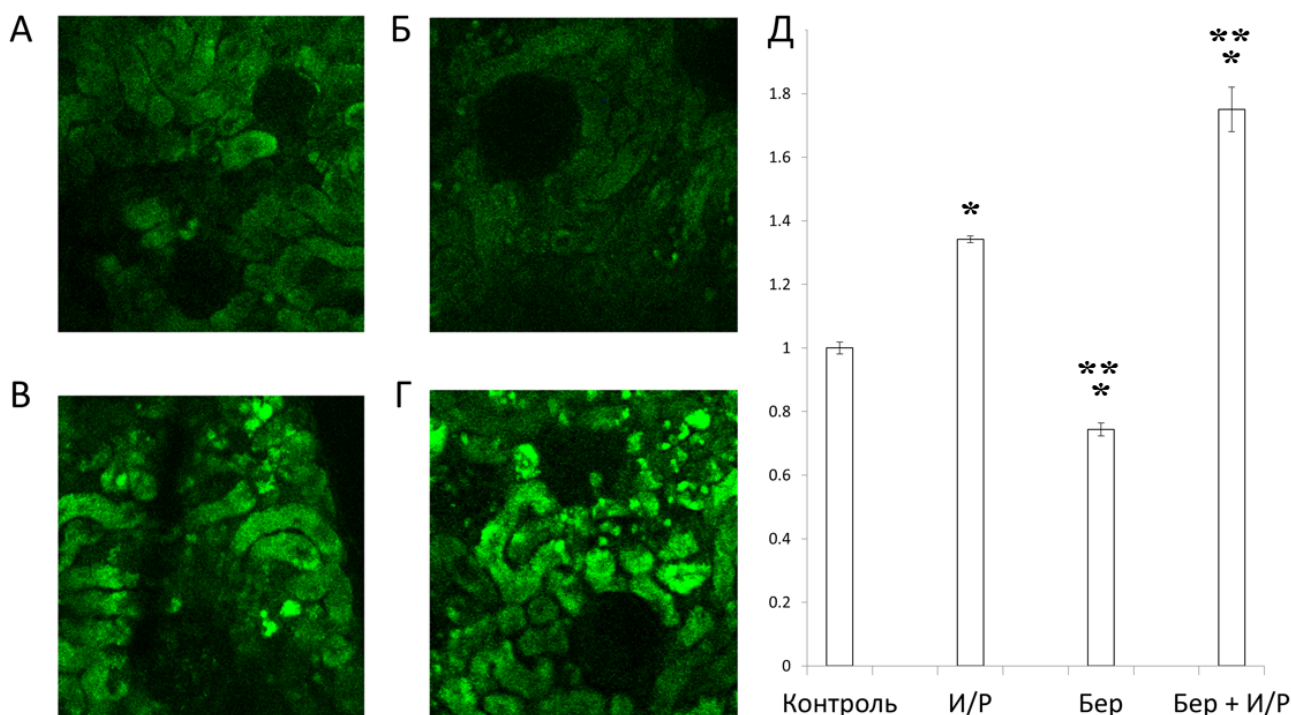


Рисунок 13. Оценка продукции АФК в ткани почки на витальных срезах. Конфокальная микроскопия витальных срезов ткани почки, окрашенных флуоресцентным зондом DCF: интактных (А) небеременных (Контроль, n=7) и (Б) беременных (Бер, n=6), (В) небеременных (И/Р, n=7) и (Г) беременных (Бер + И/Р, n=6), подвергшихся И/Р. (Д) Среднее значение флуоресценции, подсчитанное по всем изображениям во всех группах. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем, ** $p < 0.05$ по сравнению с И/Р.

Влияние плода на толерантность почки к ишемии

Помимо очевидных гормональных изменений в организме матери, связанных с беременностью, можно предположить, что часть защитного эффекта беременности при ишемическом повреждении почки может обеспечиваться факторами, связанными с плодом. В частности, имеются свидетельства возможности миграции стволовых клеток из тканей эмбриона в ткани матери. Это явление называют микрохимеризмом. В данной работе при анализе наличия единичных стволовых клеток плода в ткани почки матери явление микрохимеризма было действительно обнаружено: методом ПЦР в реальном времени в ткани почки беременных самок были детектированы клетки, несущие Y-хромосому, которые могли быть получены только от эмбрионов мужского пола (Рис.14, А). Также с помощью линии трансгенных мышей, несущих зеленый флуоресцентный белок GFP, было проверено непосредственное наличие клеток плода в почке: мать дикого типа была скрещена с GFP-трансгенным самцом. Таким образом, часть

эмбрионов матери имела клетки, обладающие зеленой флуоресценцией благодаря экспрессии белка GFP (Рис.14, Б). Затем с помощью проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии действительно были обнаружены единичные GFP-положительные клетки в ткани почки матери (Рис.14, В). Однако, никаких изменений в количестве химерных клеток при ишемическом повреждении обнаружено не было, то есть на фоне ишемии не наблюдалось увеличения количества клеток плода, мигрировавших в почку матери. В совокупности с выраженным защитным эффектом гормональной псевдобеременности, описанном выше, был сделан вывод о том, что эффект микрохимеризма (и другие потенциальные воздействия плода) не вносят значимого вклада в защиту почек от ишемического повреждения при беременности.

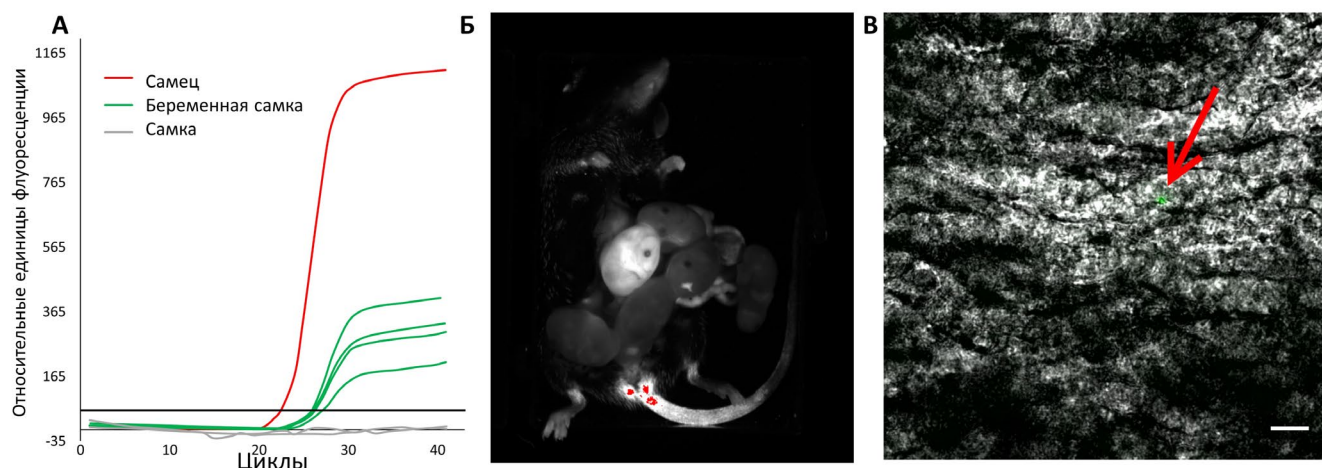


Рисунок 14. Присутствие химерных клеток плода в почке матери. (А) ПЦР в реальном времени с праймерами на ген TSPY1, локализованный на Y-хромосоме. В почке самцов присутствует положительная реакция на Y-хромосому, у самок отсутствует. В почках, изолированных из беременных самок, также присутствует продукт реакции, появляющийся на поздних циклах, что говорит о том, что в ткани этих самок также присутствуют клетки, несущие Y-хромосому, которые могли быть получены только от плода мужского пола, (Б) Флуоресцентное изображение GFP-положительного эмбриона в GFP-отрицательной матери, (В) Конфокальная микроскопия, демонстрирующая присутствие единичной GFP-положительной клетки, полученной из плода, в ткани почки матери.

ВЫВОДЫ

1. Ишемия/реперфузия почки у беременных крыс вызывает менее выраженное ОПП, чем у контрольных самок;
2. Беременность не влияла на признаки хронической почечной недостаточности через два месяца после ишемии/реперфузии почки;
3. Защитный эффект обуславливается усилением пролиферативных и регенеративных свойств клеток почки во время беременности;
4. Беременность сопровождается повышением в ткани почки факторов PCNA, GDF11, VEGF, релаксина, эритропоэтина;
5. Влияние беременности на ишемическую толерантность почки обусловлено, в первую очередь, гормональными изменениями в организме матери, поскольку псевдобеременность симулирует эффект беременности.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете

МГУ имени М.В. Ломоносова:

1. **V. A. Popkov**, N. V. Andrianova, V. N. Manskikh, D. N. Silachev, I. B. Pevzner, L. D. Zorova, G. T. Sukhikh, E. Y. Plotnikov, and D. B. Zorov. Pregnancy protects the kidney from acute ischemic injury. Scientific reports, 8(1 (14534)):1–11, 2018 **IF=4.6**
2. S. S. Jankauskas, D. N. Silachev, N. V. Andrianova, I. B. Pevzner, L. D. Zorova, **V. A. Popkov**, E. Y. Plotnikov, and D. B. Zorov. Aged kidney can we protect it? Autophagy, mitochondria and mechanisms of ischemic preconditioning. Cell Cycle, 2018 **IF=3.53**
3. S. S. Jankauskas, I. B. Pevzner, N. V. Andrianova, L. D. Zorova, **V. A. Popkov**, D. N. Silachev, N. G. Kolosova, E. Y. Plotnikov, and D. B. Zorov. The age-associated loss of ischemic preconditioning in the kidney is accompanied by mitochondrial dysfunction, increased protein acetylation and decreased autophagy. Scientific reports, (4430), 2017 **IF=4.6**
4. **В.А. Попков**, Д.Н. Силачев, С.С. Янкаускас, Л.Д. Зорова, И.Б. Певзнер, Е.Ю. Плотников, Д.Б. Зоров, Молекулярные и клеточные взаимодействия плода и матери. Беременность как фактор омоложения, Биохимия, 81 (2016), pp. 1817–1829 **IF=1.72**
5. **В. А. Попков**, Е. Ю. Плотников, Л. Д. Зорова, Д. Н. Силачев, В. А. Бабенко, С. С. Янкаускас, С. Д. Зоров, Д. Б. Зоров, Количественные подходы к прижизненному анализу морфологии митохондрий, Цитология, 58 (2016), pp. 699–706 **IF=0.57**
6. **В. А. Попков**, Е. Ю. Плотников, Д. Н. Силачев, Л. Д. Зорова, И. Б. Певзнер, С. С. Янкаускас, С. Д. Зоров, В. А. Бабенко, Д. Б. Зоров, Болезни и старение: влияние пола, Биохимия, 80 (2015), pp. 1817–1829 **IF=1.72**
7. **В.А. Попков**, Е. Ю. Плотников, К. Г. Лямзаев, Д. Н. Силачев, Л. Д. Зорова, И. Б. Певзнер, С. С. Янкаускас, С. Д. Зоров, В. А. Бабенко, Д. Б. Зоров, Миторазнообразие, Biochemistry (Moscow), 80 (2015), pp. 631–641 **IF=1.72**

Тезисы конференций и статьи в сборниках:

1. 2018 Pregnancy protects kidney from acute ischemic injury
Авторы: **Popkov V.A.**, Andrianova N.V., Manskikh V.N., Silachev D.N., Pevzner I.B., Zorova L.D., Plotnikov E.Y. & Zorov D.B.
FEBS 2018, Прага, Чехия, 7-12 июля 2018
2. 2015 Функциональная гетерогенность митохондрий в почке в норме и при ишемии/реперфузии
Авторы: **Попков В.А.**, Плотников Е.Ю., Зоров Д.Б.
19 Международная Пущинская школа-конференция Молодых Ученых «Биология - Наука XXI Века», Г. Пущино, Россия, 20-24 Апреля 2015
3. 2017 Why Does Ischemic Preconditioning Not Work In Aged Kidney
Авторы: Янкаускас С.С., Андрианова Н.В., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., **Попков В.А.**, Колосова Н.Г., Плотников Е.Ю., Зоров Д.Б.
54th Era-Edta Congress (June 3-6, 2017, Spain), Мадрид, Испания, 3-6 июня 2017
4. 2016 Стратегии антиишемической защиты. Роль митохондрий
Авторы: Зоров Д.Б., Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Зоров С.Д., **Попков В.А.**, Бабенко В.А., Янкаускас С.С.
V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России, Сочи, Россия, 4-8 октября 2016