

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

ФАКУЛЬТЕТ БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ

*на правах рукописи*

**Василий Андреевич Попков**

**Механизмы влияния беременности на ишемическое повреждение  
почек**

03.03.01 – Физиология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научные руководители:**

доктор биологических наук

Егор Юрьевич Плотников

доктор биологических наук, профессор

Дмитрий Борисович Зоров

Москва – 2019

## **ОГЛАВЛЕНИЕ**

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	3
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	9
1. Влияние беременности на регенеративные возможности организма.....	10
1.1. Потенциальные механизмы регенеративного эффекта беременности.....	13
1.2. Регуляторные сигналы, обуславливаемые плодом.....	13
1.3. Регуляторные эффекты, обуславливаемые организмом матери.....	15
1.4. Влияние беременности на продолжительность жизни.....	18
1.5. Возможные эволюционные причины регенеративного эффекта беременности.....	20
2. Влияние пола на тяжесть клинического течения заболеваний.....	22
2.1. Механизмы влияния половых различий на заболевания и смертность.....	23
2.2. Влияние пола на митохондриальные функции.....	31
3. Физиологические изменения при беременности.....	33
3.1. Адаптации почек к беременности.....	34
3.2. Гемодинамика и сосудистая система.....	35
3.3. Механизмы вазодилатации.....	36
3.4. Несахарный диабет и беременность.....	37
4. Классификация и эпидемиология острого почечного повреждения (ОПП).....	37
4.1. ОПП при беременности.....	39
4.2. Этиология ОПП при беременности.....	40
4.3. Механизмы развития ОПП.....	45
<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	60
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ</b> .....	70
1. Острое почечное повреждение при ишемии у беременных и контрольных самок.....	70
2. Влияние беременности на патоморфологические изменения после ишемии почки.....	72
3. Влияние беременности на фиброз после ишемии почки.....	74
4. Влияние беременности, возникшей после ОПП, на функционирование почек.....	76
5. Эффекты кислородно-глюкозной депривации на клетки почки беременных и контрольных животных.....	79
6. Влияние беременности на сигнальные пути регенерации и ишемической толерантности почки.....	83
7. Влияние беременности на функционирование митохондрий и окислительный стресс при ишемии почки.....	85
8. Влияние плода на толерантность почки к ишемии.....	94
<b>ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	96
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	102
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	103
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	104

# **ВВЕДЕНИЕ**

## **Актуальность и степень разработанности темы**

Острое почечное повреждение (ОПП) – нарушение функции почек, характеризующееся быстрым снижением скорости клубочковой фильтрации, которое сопровождается накоплением продуктов азотного метаболизма, водно-электролитными и кислотно-щелочными нарушениями [1]. 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% [2,3].

Беременность, в свою очередь, является значимым фактором, влияющим на патогенез ОПП. Эпидемиология ОПП во время беременности различается в странах и может достигать 10% всех беременностей в развивающихся странах, при этом смертность может достигать 18%. Кроме того, беременность увеличивает вероятность развития ОПП как осложнения других патологий, например, после сепсиса, микроангиопатии, сердечной недостаточности, преэклампсии или послеродового кровотечения. А также ОПП увеличивает вероятность развития многих патологий при беременности, в первую очередь, преэклампсии. 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 при некоторых патологиях. Показано, например, что во время беременности усиливается регенерация печени у старых крыс в четыре раза, а также уменьшается постоперационная смертность животных в пять раз [4]. Сходные эффекты были также продемонстрированы для регенерации мышц [5] и повреждения спинного мозга [6]. 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. Однако подобных фундаментальных исследований крайне мало: подавляющее количество известной по данному вопросу информации получено в клинических условиях, что затрудняет понимание и анализ фундаментальных механизмов описываемых явлений, поскольку клинические исследования и случаи оперируют сложной картиной, включающей в себя как саму патологию, так и сопутствующие осложнения и лекарственные терапии.

### **Цели и задачи исследования**

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

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**

Новизна данной работы заключается в фундаментальном изучении особенностей протекания ишемического повреждения почек при беременности.

Показано, что беременность значительно облегчает острое почечное повреждение, вызванное ишемией/реперфузией почки. Это выражалось в меньшем нарушении выводящей функции почек, которая была оценена с

использованием стандартного клинического маркера – концентрации креатинина и мочевины в крови. Также было отмечено снижение концентрации нового маркера структурного повреждения почек NGAL, активно внедряемого в клинику в крови беременных животных. С помощью гистопатологических методов было показано напрямую уменьшение повреждения ткани почки после И/Р у беременных животных: это выражалось в уменьшении количества и площади областей некроза и уменьшении количества гиалиновых цилиндров в просвете канальцев.

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

При исследовании первичных культур эпителия почечных канальцев было обнаружено, что клетки почек, выделенные из беременных животных, демонстрировали значительно большую жизнеспособность через 24 часа после повреждающего воздействия кислородно-глюкозной депривации. С помощью системы мониторинга пролиферации в реальном времени было обнаружено, что это обеспечивается значительно большей скоростью пролиферации клеток, выделенных из беременных животных, после повреждающего воздействия, тогда как скорости роста до повреждения и гибели во время повреждения значимо не отличались от клеток из контрольных животных. Это хорошо согласуется с увеличением количества белков, ассоциируемых с пролиферацией и регенерацией, таких как PCNA, GDF11, VEGF, EPO в образцах клеток, крови и тканей, полученных из беременных животных.

Также было обнаружено, что данные эффекты обуславливаются 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**

Проведённые исследования расширяют представления о механизмах развития ОПП ишемического генеза при беременности. Была продемонстрирована большая устойчивость беременных к подобному повреждению, исследованы сигнальные каскады, увеличивающие толерантность почки и обнаружена ключевая роль гормонов в обеспечении данной 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 непосредственно повреждения почек 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. Кроме того, эти данные дают возможность предположить, что терапия гормонами может быть использована как новый подход 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 теме диссертации**

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ: 7 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в Scopus или Web of Science, и 4 тезиса докладов на российских и международных конференциях.

## **Апробация результатов**

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

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 диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, методов и материалов исследования, полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 126 страницах, иллюстрирована 34 рисунками, 4 таблицами. Список цитируемой литературы включает 243 наименования.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Данная работа находится на стыке нескольких направлений исследований, и, для полноценного освещения имеющейся литературы, необходимо раскрыть их все. Сначала будут рассмотрены данные и предпосылки, позволяющие предполагать усиление регенеративных и защитных функций при беременности, поскольку именно эти работы послужили отправной точкой данного исследования. Затем будут проанализированы особенности развития патологий в зависимости от пола, поскольку большая часть литературных данных получена на самцах, и для их соотнесения с самками и беременными самками необходимо учитывать данный фактор. Затем будут освещены физиологические изменения, происходящие при нормальном течении беременности, с акцентом на функцию почек. Это необходимо, поскольку подавляющий пласт работ, посвященных ишемическому повреждению почек, сделан на небеременных животных, и, при соотнесении каких-либо результатов данной работы с мировым опытом, необходимо делать поправку на особое состояние животных. Далее будут освещены эпидемиологические, клинические и физиологические исследования, касающиеся острого почечного повреждения в норме и при беременности; рассмотрены факторы риска, особенности и известные осложнения. И в завершении будет освещена роль окислительного стресса и функций митохондрий в данных процессах, поскольку результаты многих исследований указывают на их ключевую роль в ишемическом повреждении и устойчивости к нему, в том числе и почек.

## **1. Влияние беременности на регенеративные возможности организма**

Существуют данные, указывающие на то, что беременность обладает восстанавливающим эффектом. Как известно, вынашивание ребенка сопряжено с высокими нагрузками на организм матери и риском многочисленных осложнений. Поэтому многие годы как в клинической медицине, так и в научных исследованиях, внимание было приковано к негативному влиянию беременности на здоровье матери. Тем не менее, некоторые исследования последних лет показывают, что беременность может оказывать и положительный эффект как на физиологическое состояние многих органов и тканей матери, так и в целом на продолжительность ее жизни, особенно если отсутствуют сопутствующие осложнения. В некоторых работах даже обсуждается «омолаживающее» воздействие беременности на организм матери.

На модели гетерохронного парабиоза, при котором объединяли кровотоки разных по возрасту животных, уже давно был обнаружен феномен восстановления некоторых регенеративных функций более пожилого партнера по парабиозу. Исследования последних лет были направлены на поиск биохимического фактора, поступающего в более пожилой организм от более молодого, и, в частности, были получены данные, указывающие на то, что таким восстанавливающим фактором может быть GDF11, фактор роста и дифференцировки, циркулирующий в общем кровотоке парабиотически связанных партнеров [7,8]. Однако, более подробное рассмотрение пока не дало возможности сделать заключение о том, что именно этот фактор определяет омоложение [9,10]. Эти факты интересны в связи с тем, что беременность можно рассмотреть как подобие парабиотической системы, в которой разные по возрасту организмы (молодой плод и зрелая мать) функционально объединены и, по возможности, обмениваются факторами,

которые могут оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на оба организма.

У старых мышей (10-12 месяцев) регенеративный потенциал печени, оцениваемый по скорости восстановления после удаления  $2/3$  объема, снижается вчетверо по сравнению с молодыми животными (3 месяца) и значительно увеличивается смертность после подобного повреждения [4]. Также у старых животных нарушается свертываемость крови, обуславливаемая нарушением синтетических функций печени. При этом скорость восстановления объема печени после гепатэктомии у старых животных в третьем триместре беременности не ниже, чем у молодых животных: у молодых небеременных и старых беременных животных через 2 дня после операции печень восстанавливает объем почти до исходных размеров, тогда как у старых небеременных животных объем восстановившейся печени составляет менее 50% от исходного. Кроме этого, беременность в 5 раз снижает смертность старых животных после операции. Свертываемость крови у старых беременных мышей находится в пределах нормы, в отличие от старых небеременных, что указывает на то, что печень не только восстанавливает объем, но и свои синтетические функции. Авторами опубликованной работы [4] был проанализирован механизм регенерации печени, и было выявлено, что беременность у старых животных активирует гипертрофию клеток, тогда как у молодых животных регенерация идет преимущественно за счет гиперплазии клеток: по оценкам авторов гепатоциты у беременных старых животных увеличиваются в 5 раз по сравнению с небеременными; при этом почти на порядок меньшее количество из них имеет признаки усиленной пролиферации. После разрешения беременности процессы гиперплазии активируются и у родивших животных, что указывает на целенаправленный сдвиг процессов регенерации в пользу гипертрофии под воздействием беременности. Эти изменения связывают с активацией Akt/mTORC1 сигнального пути: его ингибирование блокирует процессы гипертрофии, а активация во многом симулирует эффекты беременности.

Другой частый объект исследования регенерации – скелетные мышцы. Индекс регенерации мышц у 20-месячных мышей почти в 10 раз ниже, чем у 3-месячных [9]. Сходным образом с вышеописанными изменениями регенерации печени под воздействием беременности показано, что беременность примерно в 2 раза ускоряет регенерацию поврежденных мышц как у старых (12 месяцев), так и у молодых животных [5]. Количество миосателлитов, стволовых клеток мышц, значимо не изменяется между группами, что указывает на то, что падение регенеративных функций не связано с истощением их пула. Падение регенеративного потенциала мышц с возрастом связывают с регуляторными изменениями, в частности, с деактивацией сигнального пути Notch [11]. Беременность обращает данное изменение, возвращая уровень активности данного сигнального пути у старых животных на уровень молодых. Влияние беременности на регенерацию поврежденной сердечной мышцы напрямую пока не было проанализировано, однако ретроспективный анализ данных больных с кардиомиопатией показал, что более чем у 50% беременных или недавно родивших женщин спонтанно восстанавливается функционирование сердца – это самый высокий показатель восстановления среди всех сердечных патологий [12–14].

Другим важным положительным эффектом беременности на организм матери является защита центральной нервной системы. Например, в клинических исследованиях влияния беременности на течение рассеянного склероза было показано, что во время беременности наблюдается меньшее количество обострений [15,16]. Это коррелирует с уменьшением количества и размера областей активного разрушения белого вещества мозга [17]. Показано, что рожавшие женщины имеют сниженный риск развития рассеянного склероза по сравнению с нерожавшими [18], более того, защитный эффект нескольких беременностей суммируется [19]. На животной модели рассеянного склероза (инъекции лизолецитина в спинномозговой канал) у беременных мышей показано уменьшение объема повреждения на 50%, а также значительное увеличение количества олигодендроцитов и

ремиелинизированных аксонов в области повреждения [6]. Предполагается, что подобный эффект частично обуславливается воздействием пролактина: его введение также стимулировало деление олигодендроцитов в зоне поражения.

### ***1.1. Потенциальные механизмы регенеративного эффекта беременности***

Существует несколько механизмов, которые могли бы объяснить восстанавливающие эффекты беременности на организм матери. Скорее всего, наблюдаемые эффекты обуславливаются комбинацией нескольких, а возможно и всех перечисленных ниже факторов. Подобные механизмы можно разделить на две большие группы: обуславливаемые плодом или организмом матери.

### ***1.2. Регуляторные сигналы, обуславливаемые плодом***

Объяснением восстанавливающего эффекта беременности может служить донирование плодом способных к дифференцировке клеток. Регенеративные свойства стволовых клеток на данный момент являются общепризнанными: например, описаны терапевтические эффекты инъекций стволовых клеток при повреждениях мозга, печени, почек [20,21]. Часть клеток плода попадает в кровоток и ткани матери – это явление носит название микрохимеризма. В крови и тканях матери клетки плода обнаруживают даже через несколько десятилетий после беременности. Так, клетки, несущие Y-хромосому, были обнаружены в крови женщины, родившей сына за 27 лет до взятия анализа [22]. На данный момент отсутствует консенсус о механизмах воздействия микрохимерных клеток на организм матери. Обсуждают два возможных направления действия этих клеток: регуляторные воздействия и непосредственная дифференцировка в необходимый для регенерации тип клеток у матери. В первом случае предполагается, что ограниченное количество клеток плода выступает своеобразными координаторами процесса

регенерации. Так, при регенерации скелетных мышц матери, клетки плода регулируют воспалительный ответ, уменьшая продукцию TGF- $\beta$ , и направляют процесс регенерации по безрубцовому типу, сходному с регенерацией плода [23].

Непосредственный вклад в регенерацию микрохимерных мультипотентных клеток был показан на модели повреждения сердца. Клетки плода активно мигрируют в область повреждения в сердце матери (при отсутствии повреждения число клеток плода в сердце было в 20 раз меньше), после чего претерпевают дифференцировку в полностью функциональные кардиомиоциты, которые сокращаются синхронно с окружающими их клетками [24].

В другом исследовании показано присутствие микрохимерных клеток, демонстрирующих признаки дифференцировки по нейрональному типу в мозгу беременных крыс, причем их количество возрастает у животных с индуцированной болезнью Паркинсона [25]. Сходным образом показано значимое увеличение присутствия микрохимерных клеток после повреждения печени [26] и легких [27].

В последние несколько лет были отмечены положительные эффекты гетерохронного парабиоза на организм более старого парабионта. В этих экспериментах хирургическим путем объединяли кровотоки двух разновозрастных животных, и было показано, что подобная операция во многом оказывала оздоровительный эффект на старую особь. Так, в этих экспериментах был показан регенеративный эффект парабиоза на сердце [8], скелетные мышцы [28], печень [29], мозг [30–32] и миелинизацию спинного мозга [33]. Сходный, но менее выраженный, эффект имели инъекции крови молодых животных. На текущий момент предполагается, что данный эффект обусловлен «ювенильными» регуляторными факторами, поступающими в старый организм из молодого. В частности, обсуждаются и исследуются функции белка GDF11 как одного из таких факторов [7,8,34]. Представляется

допустимым рассматривать беременность как своеобразную форму парабиоза: организм матери (взрослой/старой особи) тесно связан с организмом плода (молодой особи). Безусловно, полного смешения кровотока в данном случае не происходит, но это не мешает обмену регуляторными факторами.

### **1.3. *Регуляторные эффекты, обуславливаемые организмом матери***

Источником регуляторных восстанавливающих факторов может являться и сам организм матери. Во-первых, беременность помимо всего прочего усиливает продукцию «стандартных» женских гормонов, в частности, эстрадиола. Нами уже подробно рассматривалось влияние женского пола и женских гормонов на здоровье и продолжительность жизни [35]. Ниже мы кратко опишем феномены, которые важно рассмотреть в рамках данной работы. Известно, что ожидаемая продолжительность жизни женщин на 5-10 лет больше, чем у мужчин. Смертность женщин почти от любой группы заболеваний меньше, чем у мужчин [36]. Более того, для многих заболеваний отмечается, что у женщин они начинают проявляться на 5-10 лет позже [37–42]. В целом, большинство работ в данной области позволяют высказать предположение, что женщины стареют медленнее мужчин. По крайней мере, часть обозначенных выше положительных эффектов обуславливается женскими половыми гормонами. Во-первых, для многих групп заболеваний отмечается снятие «защитающего эффекта» женского пола после наступления менопаузы, то есть после заметного падения выработки женских гормонов [43–47]. Гормональная терапия постменопаузных женщин для некоторых заболеваний оказывает защитающее воздействие [48]. Более того, для ишемических повреждений органов прямо продемонстрированы защитающие воздействия эстрогенов [44,49–52]. Таким образом, определенный вклад в суммарный эффект беременности на омоложение организма безусловно оказывает увеличение «женственности», благодаря повышению продукции женских половых гормонов.

Ложная беременность, индуцированная спариванием с бесплодным самцом, характерная для некоторых видов животных, у которых половой акт инициирует гормональные изменения, сходные с начальными сроками беременности, в частности, повышение концентрации прогестерона [53], приводит к тем же изменениям в гипертрофии гепатоцитов, что и беременность начальных сроков (но меньшим, чем беременность поздних сроков) [4]. Аналогично, ложная беременность приводит к такому же усилению регенерации мышц, что и настоящая беременность [5]. Стоит отметить, что инъекции прогестерона, одного из основных гормонов беременности, не оказывают никакого эффекта на регенерацию мышц. В то же время инъекции пролактина – другого основного гормона, сопутствующего беременности, – приводят к усилению пролиферации олигодендроцитов и восстановлению поврежденных миелиновых оболочек в моделях рассеянного склероза, аналогично эффекту обычной беременности [6]. В данном случае, никакие факторы, продуцируемые плодом, не могли играть роли, поскольку сам плод отсутствовал.

Безусловно, эффекты беременности на организм матери так или иначе опосредуются через сигнальные каскады. Не удивительно, что каскады, ассоциируемые с защищающим воздействием беременности, ассоциируются и с другими защитными механизмами. Так защищающий эффект беременности на сердце и печень связывают с активацией сигнального пути Akt [4,54]. Этот же сигнальный путь и входящие в него сигнальные молекулы связывают с большим спектром защищающих и регенеративных эффектов. В первую очередь, это защита от ишемических повреждений различных органов [54] и регенерация после повреждений. Данный эффект включает изменение активности широкого круга регуляторных белков, каждому из которых посвящено огромное количество статей, описывающих их роль в различных патологиях и болезнях: eNOS [55], GSK-3 $\beta$  [56], VEGF [57], NF- $\kappa$ B [58], Nrf2 [59], mTOR [60], Bcl-2 [61]. Во многом защитные свойства определяются центральной ролью данного сигнального пути в процессах регенерации через

регуляцию пролиферации, миграции, дифференцировки и выживания мезенхимальных стволовых и прогениторных клеток [62]. Более того, mTOR напрямую вовлечен в изменение скорости старения, и его функционирование определяет продолжительность жизни, хотя связь здесь пока не очень однозначная, учитывая наличие нескольких комплексов, в которые входит mTOR [63–65]. Улучшение регенерации мышц у старых животных при беременности связывают с обращением возрастных изменений в другом фундаментальном регуляторном каскаде Notch [5], который также является одним из основополагающих в клеточном метаболизме и традиционно ассоциируется с эмбриональным развитием. В рамках нашей работы важно, что в последние годы активно обсуждается его роль в старении и развитии старческих заболеваний [66].

Описанные выше механизмы потенциального регенеративного воздействия беременности на материнский организм не являются взаимоисключающими. Например, гетерохронный парабиоз значительно усиливает регенерацию мышц старых животных, а объединение кровотоков молодой беременной самки со старым животным удваивает этот эффект так же, как и в случае влияния беременности на усиление регенерации мышц у молодых и старых самок [5]. Это позволяет говорить о том, что эффект увеличенной регенерации мышц старого животного, имеющего объединенный кровоток с молодой беременной самкой, обуславливается не только наличием регуляторных ювенильных факторов в крови молодого животного, но и дополнительным специфическим вкладом факторов, ассоциированных с беременностью.

Основополагающим является вопрос об относительном вкладе каждого из факторов в восстанавливающий эффект на организм матери, на который на текущий момент нет однозначного ответа. Эти знания позволили бы разрабатывать конкретные клинические подходы, направленные как на

защиту беременных женщин, так и, возможно, на оздоровление остальной популяции людей.

#### **1.4. *Влияние беременности на продолжительность жизни***

Обсуждение восстанавливающего эффекта беременности на организм матери было бы неполным без анализа продолжительности жизни рожающих животных. В экологии и геронтологии часто описывают феномен обратной корреляции между репродуктивным потенциалом и продолжительностью жизни: чем активней размножается организм, тем меньше его ожидаемая продолжительность жизни. В 1997 году на основании этих наблюдений Кирквуд сформулировал «теорию одноразовой сомы» [67], которая обсуждает экологические и эволюционные стратегии распределения ресурсов между репродуктивными функциями и поддержанием функционирования сомы отдельного организма. Безусловно, данная теория не является абсолютной и применима, в первую очередь, к анализу видов и стратегий размножения, а не к отдельным особям внутри вида. Тем не менее, существуют данные, что эта модель может быть справедлива и для сравнения популяций одного вида [68,69]. Более того, некоторые исследования позволяют предположить, что эта теория может быть применима и к людям. Так, при ретроспективном анализе продолжительности жизни евнухов при корейском императорском дворе (данные включали свыше 80 человек за период с XIV по XX века) было показано, что средняя продолжительности их жизни превышала продолжительность жизни обычных людей на 14-19 лет [70]. Существуют сходные генеалогические исследования английской аристократии, говорящие о том, что бездетные женщины жили дольше, чем имевшие детей [71]. С другой стороны, статистические исследований популяций людей часто утверждают обратное: например, в исследовании продолжительности жизни 15 тысяч близнецов продолжительность жизни близнеца, ставшего отцом или матерью, была выше, а не ниже, чем у их бездетных братьев и сестер [72]. К сожалению, данные исследования обладают рядом недостатков, которые не

позволяют экстраполировать полученные результаты на всю популяцию. Например, невозможно исключить влияние сниженной продукции тестостерона у кастратов, или нельзя исключить социальную помощь детей престарелым родителям. Также эти исследования не позволяют отличить бездетность, вызванную заболеваниями, от осознанного выбора не иметь детей.

Частично обойти эти недостатки помогает генеалогическая статистика, которая в некоторых популяциях людей достаточно подробна и обладает большой выборкой. В силу очевидных причин данные исследования в основном рассматривают деторождение женщин: во-первых, количество детей можно с высокой долей достоверности оценить именно у женщин; во-вторых, женский организм претерпевает несравнимо большие физиологические изменения и нагрузки во время размножения; в-третьих, благодаря наличию менопаузы существует возможность сравнивать продолжительности жизни только женщин, доживших до завершения репродуктивного периода, что исключает обратное влияние продолжительности жизни на потенциальную возможность завести больше детей.

Ретроспективные анализы различных популяций людей до 10 тысяч человек (саамов [73], амишей [74], жителей Квебека [75], Юты [76], Уэльса [77]), охватывающие временной промежуток от XVII века до наших дней, позволяют прийти к сходным выводам: поздний возраст рождения последнего ребенка положительно коррелирует с высокой продолжительностью жизни [78]; большое количество детей (свыше 10-14) или их отсутствие коррелирует отрицательно; возраст первой беременности не играет особого значения.

Результаты данных работ, как и любые корреляционные исследования, не отражают наличия прямой зависимости между исследуемыми явлениями. Например, корреляция между возрастом рождения последнего ребенка и продолжительностью жизни матери может отражать обратные причинно-

следственные связи: чем здоровее мать и чем медленнее она стареет, тем позже она способна родить последнего ребенка. Тем не менее, несмотря на неоднозначность интерпретации, озвученные выше факты, безусловно, важны для понимания взаимосвязи беременности, здоровья и продолжительности жизни матери.

### **1.5. *Возможные эволюционные причины регенеративного эффекта беременности***

Для понимания феномена регенеративного эффекта беременности стоит отметить эволюционные механизмы, возможно приведшие к его появлению. Существует две разные экологические стратегии размножения: К- и r- [79]. r-стратегия заключается в большой плодовитости, высокой смертности потомков, коротком времени беременности и взросления, короткой продолжительности жизни и, как следствие, высокой скорости сменяемости поколений. Типичными представителями этой стратегии среди млекопитающих являются почти все грызуны. К-стратегия во многом противоположна: небольшое потомство и забота о нем, долгое взросление, низкая смертность, высокая продолжительность жизни и медленная сменяемость поколений. Типичными представителями этой стратегии являются крупные млекопитающие: люди, тигры, слоны, киты. Для нашей работы важно отметить, что на продолжительность жизни представителей r-стратегии оказывается отрицательное эволюционное давление, призванное снизить конкуренцию между родителями и потомками. Подобного давления почти лишены представители К-стратегии: их малая численность, низкая плодовитость и долгое взросление приводят к тому, что конкуренция между родителями и детьми достаточно низкая и они могут себе «позволить» длинную продолжительность жизни и даже жизнь после завершения репродукции (как животные с менопаузой).

Эволюционно оправдано может быть поощрять деторождение (или компенсировать негативные его последствия) увеличением

продолжительности жизни. Но данный эффект может по-разному проявляться у представителей разных стратегий размножения. Во-первых, увеличенная продолжительность жизни старшего поколения ведет к увеличению внутривидовой конкуренции у представителей r-стратегии. Во-вторых, потенциальная дополнительная беременность в старшем возрасте дает больше преимуществ представителям K-, но не r-стратегии: последним «выгодней» за те же ресурсы и то же время «позволить» размножиться новому поколению, которое не будет подвержено влиянию негативных аспектов возрастной беременности. Представителям K-стратегии, несмотря на те же негативные последствия позднего деторождения, может быть оправдано «позволить» возрастной, но «проверенной» предыдущими родами, особи родить еще раз, поскольку молодое поколение долго взрослеет и долго входит в репродуктивный возраст. Кроме того, увеличенная продолжительность жизни старшего поколения может быть выгодна представителям K-стратегии, даже если они не размножаются. В качестве примера можно привести заботу о чужом потомстве постменопаузными самками (так называемые «бабушки», например, у касаток [80]), или защиту молодняка от хищников взрослыми животными. Для представителей r-стратегий такое сложное социальное поведение и сопутствующие ему выгоды от наличия старых особей в популяции не характерно. Вышеизложенные соображения могут приводить к тому, что увеличенная продолжительность жизни «проверенных размножением» организмов гораздо выгоднее представителям K-стратегии, чем r-, для которых ценность отдельно взятой особи для популяции невелика.

Эти теоретические размышления несут крайне важное практическое соображение: мыши и крысы являются представителями r-стратегии, в отличие от людей, и на обычные сложности экстраполяции результатов с животных на человека накладывается еще одно заметное ограничение. Возможно, эксперименты на таких лабораторных животных, как собаки (или других доступных представителях K-стратегии) были бы более надежны в экстраполяции данных на людей.

## **2. Влияние пола на тяжесть клинического течения заболеваний**

Перед описанием острого почечного повреждения в норме и при беременности, необходимо осветить еще один важный аспект – влияние пола на течение заболеваний, в том числе, почек. Это необходимо, поскольку подавляющее большинство работ проводится на самцах, в то время как беременными могут быть только самки, а значит и контролем к ним служат небеременные самки. Таким образом, при соотнесении результатов данной работы с мировым опытом необходимо учитывать, что этот опыт был получен преимущественно на самцах. Обзору подобных половых различий, с акцентом на интересующих нас патологиях, посвящен данный раздел.

Смертность от заболеваний сердечно-сосудистой системы в совокупности значительно опережает смертность от всех остальных заболеваний. В этой же группе заболеваний наблюдаются одни из самых больших различий между мужчинами и женщинами. Многие заболевания этой группы у женщин начинают развиваться на 10 лет позже: это и инфаркт миокарда [2–4], и ишемическая болезнь сердца [3], сердечная недостаточность [5], кардиомиопатии [6], аритмии [7]. У многих заболеваний есть тенденция к снятию «защитающего эффекта» женского пола после менопаузы [8–12]. Смертность женщин от инфаркта миокарда выше в молодом возрасте [13], а у мужчин в старом [14]. Смерть от разрыва миокарда чаще встречается у мужчин [15]. При этом нарушения, связанные с гормональной регуляцией, такие как диабет или ожирение, являются более серьезными факторами риска у женщин при инфаркте миокарда [2], заболеваниях коронарных артерий [16] и гипертонии [17,18]. Аутоиммунные заболевания, наоборот, встречаются гораздо чаще у женщин (при отдельных заболеваниях до 10 раз чаще [19]). При этом у мужчин может быть худший прогноз, если заболевание все-таки появилось [20,21]. Почечная недостаточность у мужчин развивается вдвое быстрее [22,23], и мужской пол в клинике считается серьезным отягчающим фактором при этих патологиях: так терминальная почечная недостаточность у

мужчин встречается на 10% чаще [24]. Однако у мужчин снижены признаки анемии при этой патологии, а у женщин повышены. Если же почечная недостаточность отягощена диабетом, то уже женский пол будет являться отягчающим фактором [25]. Значительные различия у мужчин и женщин обнаруживаются и в ряде неврологических заболеваний. Так, рассеянный склероз чаще встречается у женщин [26], но прогноз хуже у мужчин [27]. Инсульты в 2-3 раза чаще случаются у женщин и имеют худший прогноз [28–30]. У мужчин чаще встречается фокальная эпилепсия, а у женщин – идиопатическая эпилепсия [31].

Выше приведены только некоторые примеры очень заметной разницы, небольшие же различия в патогенезе и клинических проявлениях заболеваний, статистике смертности и выживания, реакции на лекарства наблюдаются фактически во всех группах заболеваний (подробнее см. [32]). Тем не менее, изложенных выше примеров достаточно, чтобы понять: многие заболевания, уже возникнув, развиваются у мужчин и женщин по-разному, что частично снимает вопрос о социальных факторах. Вплоть до случаев, когда определенное вещество действует на один пол и не действует на другой: например, здоровые мужчины отвечают на инъекцию ангиотензина II повышением скорости клубочковой фильтрации, а женщины – нет [33], что свидетельствует о большей возможности повышать кровяное давление в клубочках, и может вносить существенный вклад в реакцию на повреждающие воздействия у мужчин.

### **2.1. *Механизмы влияния половых различий на заболевания и смертность***

Кроме социально-поведенческих факторов, таких как склонность к риску и вредным привычкам, особенности протекания заболеваний и смертности у мужчин и женщин, очевидно, вызываются биологическими различиями. Наличие этих различий на уровне целого организма неоспоримо, чуть менее известны несоответствия на уровне отдельных органов, и совсем

редко можно встретить исследования несхожести отдельных клеток, органелл и молекул. Различия на всех этих уровнях организации и будут рассмотрены ниже.

*Физиологические различия.* Вес мужчин в среднем на 15% больше, чем у женщин [34]. У них крепче кости, прочнее сухожилия и связки [35], больше отношение мышечной массы к массе тела [36]. У женщин выше процент жировой ткани. Мышечная сила мужчин в среднем превосходит на 40-60% силу женщин [37]. Объем легких мужчин больше на 56% даже с поправкой на массу тела [38]. Сердце у мужчин больше по массе и размеру, в частности, левый желудочек больше на 30% [39]. У женщин ниже кровяное давление, а сердце бьется чаще, даже во сне. В крови мужчин больше концентрация красных кровяных телец и гемоглобина, выше емкость насыщения кислородом. У женщин больше концентрация белых кровяных телец, в том числе гранулоцитов, В- и Т-лимфоцитов. У мужчин быстрее заживают раны, а также выше болевой порог. В результате вазоконстрикции у женщин холоднее наружные слои кожи, но теплее внутренние, благодаря этому у женщин ниже теплопотери. Почки у женщин также меньше [40] и в них на 15% меньше клубочков [41], подобные различия наиболее ярко наблюдаются после достижения половой зрелости [42], что обуславливается гипертрофией у мужчин клеток проксимальных и, в меньшей степени, дистальных канальцев под действием андрогенов [43]. Как следствие, ток крови через почки выше у самцов, а у самок тонус почечных сосудов выше, что также обуславливается эффектом половых гормонов [44]

*Различия на клеточном уровне.* Физиолого-анатомические различия между мужчинами и женщинами как в норме, так и при патологиях, предполагают различия в энергетическом обмене. Различия в строении мышц, работе сердца, температурном режиме, емкости насыщения крови кислородом однозначно требуют от мужчин большего потребления кислорода. Более того, среди заболеваний самые заметные различия наблюдаются в группе сердечно-

сосудистых патологий и воспалительных реакций, значительный, если не лидирующий, вклад митохондрий в которые общеизвестен [48]. В связи с этим возникает закономерное предположение о возможном различии функции митохондрий, редокс гомеостаза и реакции на окислительный стресс между мужчинами и женщинами.

Показано, что основной обмен у женщин ниже, чем у мужчин с учетом поправки на клеточную массу тела [49–52]. Система транспорта кислорода также оказывается зависимой от пола: парциальное давление кислорода, при котором происходит 50%-ное насыщение гемоглобина, у женщин значительно выше, чем у мужчин [53], что накладывается на уже упомянутое более низкое содержание эритроцитов и гемоглобина в целом. В ряде работ показано, что у «мужских», т.е. полученных от особи мужского пола, клеток наблюдается сдвиг редокс-статуса в сторону более окисленного состояния [54] по сравнению с «женскими» клетками. В частности, в гладкомышечных клетках сосудов самцов крыс выявлена бóльшая концентрация перекиси водорода, а в клетках самок была показана повышенная концентрация восстановленного глутатиона, выше активность супероксиддисмутазы и каталазы в норме [54–56]. Кроме того, у самцов крыс было показано увеличенное количество карбонилированных белков в печени [57] и мозге [58]. Гладкомышечные клетки сосудов, полученные от самцов крыс, были менее устойчивы к окислительному стрессу, индуцированному ультрафиолетом, чем женские клетки: в клетках самцов отмечалась увеличенная продукция 4-гидроксиноненаля (4-HNE) (продукта окисления липидов мембраны). Больше мужских клеток умирало вследствие аноикса (вид апоптоза, связанный с потерей контакта с базальной мембраной), тогда как женские клетки демонстрировали устойчивость к аноиксу и большую склонность к процессам аутофагии, а не апоптоза. Утверждается, что повышенная концентрация активных форм кислорода (АФК) в мужских клетках может активировать работу некоторых металлопротеаз, вызывая деградацию части необходимых для устойчивости к аноиксу белков: было показано, что под

воздействием окислительного стресса у мужских клеток уровень этих ферментов падал сильнее, чем у женских [54].

Связь аутофагии, работы митохондрий, окислительного стресса, апоптоза с заболеваниями сердца, печени, диабета и других патологий достаточно хорошо изучена [59,60]. Она заметна и в различиях между полами: показано, что маркеры аутофагии по-разному экспрессируются в разных тканях в зависимости от пола. В среднем, у самцов их больше, что можно связать с повышенной концентрацией АФК [61]. Однако под действием окислительного стресса или голодания у самок количество маркеров аутофагии возрастает, а у самцов падает, что сочетается с большей склонностью к апоптозу, как было показано на культурах нейронов, фибробластов и гладкомышечных клеток сосудов [54,62,63].

Было обнаружено [55], что у самцов в гладкомышечных клетках сосудов и клетках эндотелия ниже экспрессия RLIP76–переносчика, необходимого для энергозависимого транспорта из клеток различных веществ, в том числе и GS-HNE, продукта окисления липидов, накопление которого в клетках приводит к апоптозу. При этом мужские клетки были более чувствительны к воздействию перекиси, а концентрация 4-HNE была выше у самцов как в контроле, так и в условиях стресса. Интересно, что эстроген вызывал увеличение экспрессии RLIP76 у самок почти вдвое, но не оказывал эффекта на самцов. Аналогично, добавление антител на этот белок или его сайленсинг с помощью РНК отменяли защитные эффекты у клеток самок, а также снижали количество восстановленного глутатиона, однако не оказывали воздействия на клетки самцов. Этот пример достаточно убедительно показывает: различия между клетками самок и самцов могут быть не только количественные, но и качественные – очевидно, что основные механизмы защиты от окислительного стресса у самцов в отличие от самок почти не включают в себя работу данного белка.

Еще более показателен пример с особями, мутантными по гену деацетилазы гистонов HDAC5, не чувствительной к сигналам: эта модификация, вызывающая в том числе, нарушение функции и морфологии митохондрий в сердце, была летальна для 100% самцов, и только для 25% самок. Введение эстрогена трансгенным самцам понижало смертность до уровня самок [64].

*Различия, опосредованные гормональным фоном.* Роль половых гормонов в изучаемых различиях не была рассмотрена выше по причине того, что она слишком обширна и велика без «сужения» круга функций. Общепринятым считается то, что именно эстроген (как основной женский гормон) обеспечивает устойчивость к заболеваниям у женщин, а тестостерон (как основной мужской гормон), напротив, обуславливает тяжесть заболеваний у мужчин. Самки мышей переживают инфаркт миокарда лучше, при этом введение им тестостерона ухудшает протекание заболевания, а введение эстрогена самцам оказывает защищающий эффект [15]. Андрогены увеличивают кровяное давление у самцов, а кастрация его уменьшает [65,66]. Кастрация самцов крыс уменьшает почечные повреждения при ишемии, а удаление яичников у самок усиливает. Введение тестостерона усиливает повреждения у самцов и у самок без половых желез, а эстроген ослабляет повреждения у овариэктомированных самок [9]. Лечение эстрогеном постменопаузных женщин облегчает протекание некоторых форм почечной недостаточности [67]. Эти факты не могут быть объяснены антиоксидантными свойствами самого эстрогена, т.к. его концентрация в крови слишком мала. Эстрадиол обеспечивал выраженные кардиопротекторные свойства в модели травмы сердца у крыс, опосредуемые, в том числе, его влиянием на митохондриальный фактор транскрипции TFAM, метаболизм азенозинтрифосфата (АТФ) и функции митохондрий [68]. Считается, что эстроген и тестостерон регулируют работу NADPH оксидазы, что приводит к уменьшенной продукции АФК у самок и увеличенной у самцов [69,70]. В работе Giordano и соавторов показано, что астроциты самцов мышей и крыс

более чувствительны к окислительному стрессу, чем астроциты самок. Авторы связывают это с экспрессией Paraoxonase 2 (PON2), антиоксидантного белка, ассоциированного с митохондриями, которая была выше в мозгу контрольных самок, но не у самцов или стерилизованных животных. Нокаутные по гену этого белка клетки не имели разницы в чувствительности к прооксидантам: перекиси водорода или 2,3-диметокси-1,4-нафтохинону, между полами. Эстрадиол вызывал увеличение экспрессии этого белка у обоих полов и увеличивал устойчивость клеток к стрессу, вызываемому этими веществами, но не оказывал эффекта на нокаутные по этому белку клетки [71]. Регуляторная функция половых гормонов многообразна. У самок инактивирована путем фосфорилирования киназа гликоген синтазы 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) – ключевой фермент сигнальных механизмов ишемического повреждения и антиишемической защиты [72,73]. Также у самок в большой степени инактивирован MAPK-p38 сигнальный путь, и ниже уровни экспрессии провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL1, IL6 [74,75]. Эндотелиальная NO синтаза, наоборот, активирована у самок [76,77]. Все эти изменения связывают с защитой различных органов от ишемических повреждения. В исследовании экспрессии генов, ассоциированных с работой митохондрий, было показано, что половые различия не постоянны на протяжении всей жизни и меняются с возрастом [78]. Так, молодые самки и самцы отличаются по экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом жирных кислот и апоптозом. В зрелом возрасте добавляются различия в экспрессии генов пируват дегидрогеназного комплекса и усиливаются различия в апоптотических генах (у самцов обнаружена повышенная экспрессия про-апоптотических генов). К старости появляются различия по экспрессии генов окислительного фосфорилирования, в частности комплекса 1 и 4, с большей экспрессией белков этих комплексов у самок. Это исследования согласуются как с предположениями о различиях в метаболизме митохондрий, максимально проявляющимися с возрастом, так и многочисленными свидетельствами о большей склонности к апоптозу мужских

клеток. Экспрессия генов, ответственных за метаболизм жирных кислот, при гипертрофическом ответе на упражнения возрастала у самок больше, чем у самцов, что может указывать на роль половых различий в доступности субстратов окисления в сердце [79,80]. На это же указывает исследование, показавшее, в частности, что с возрастом у мужчин больше, чем у женщин в митохондриях мозга происходит сдвиг в сторону использования в качестве энергетического субстрата кетоновых тел и жирных кислот, а эстрадиол выступает антагонистом подобных изменений в пользу окисления глюкозы [81]. Стерилизация самок приводила к сильному уменьшению потребления глюкозы и увеличению потребления кетоновых тел и жирных кислот [82]. Есть данные, указывающие на то, что рецепторы эстрогена могут быть активированы различными факторами роста, а не только эстрогеном. Более того, максимальная активность этих рецепторов в разных органах может проявляться в разные фазы овариального цикла у самок, независимо от общей концентрации циркулирующих эстрогенов [83]. Клинические данные о влиянии гормональной терапии на заболевания людей не столь однозначны, как исследования на животных. Мужчины, проходящие андроген-подавляющую или эстрогеновую терапию в связи с раком простаты, среди прочего, имели больший риск развития сердечно-сосудистых заболеваний [84–86]. Более того, у мужчин с низким уровнем тестостерона риск развития сердечно-сосудистых заболеваний выше, а не ниже, чем у обычных мужчин [87]. Интересны исследования транссексуалов: у бывших мужчин, получающих как эстрогены, так и анти-андрогены, сердечно-сосудистых заболеваний больше, чем у бывших женщин, получающих тестостерон и больше, чем у остальной популяции [88]. Смертность женщин от сердечно-сосудистых заболеваний действительно растет после менопаузы, но эти изменения не столь сильны, как, например, уменьшение злокачественности новообразований молочной железы после наступления менопаузы [89]. Это позволяет говорить о том, что изменение смертности может быть просто возрастным и не иметь прямого отношения к падению уровня эстрогенов. К тому же, сердечно-

сосудистые заболевания имеют длительный латентный период до клинических проявлений. В качестве альтернативы можно предположить, что большую роль играет не защита женского пола до менопаузы и ее ослабление после, а ускоренное протекание латентной фазы заболеваний у мужчин в раннем возрасте.

*Генетические различия.* Сказанное выше указывает на важную роль половых гормонов в рассматриваемых различиях между полами. Но важно понимать, что клетки мужчин и женщин также отличаются генетически на уровне половых хромосом. На Y-хромосоме находится всего около 200 генов, среди которых минимум 72 кодируют белки. Такое маленькое количество генов связано с тем, что Y-хромосома имеет очень высокий уровень мутаций из-за большого количества делений, происходящих при созревании сперматозоидов, а также из-за высокого окислительного стресса, вызываемого их активным движением. На это накладывается крайне неэффективный отбор, вызываемый невозможностью рекомбинации с X-хромосомой. Все это приводит к тому, что жизненно важные гены постепенно перемещаются на X-хромосому, тогда как на Y-хромосоме остаются гены, необходимые только самцам и, возможно, вредные для самок. В свете вышеприведенных фактов можно допустить, что эти гены вредны и для самцов, но при этом для чего-то необходимы. Предсказывается, что в достаточно скором по эволюционным меркам времени человеческая Y-хромосома лишится всех генов. Среди млекопитающих присутствуют несколько видов, дошедших до такой стадии, например, слепушонки (*Ellobius tancrei*), у которых все особи имеют генотип XX [90], а слепушонки другого вида (*Ellobius lutescens*) все имеют генотип X0 [91]. У мужчин с возрастом могут появляться клетки, не имеющие Y-хромосомы. Это коррелирует со сниженной продолжительностью жизни, а также с более высокой вероятностью заболеть некоторыми формами рака. Тем не менее, это представляется скорее следствием каких-либо патологий, чем причиной [92]. Более того, на данный момент нет заболеваний, не связанных с репродуктивной функцией, для которых была бы установлена связь с

мутациями генов Y-хромосомы. Отсутствие жизненно важных генов на Y-хромосоме вполне логично – женская половина человечества обходится без нее. Поскольку уровнем гормонов легче манипулировать экспериментально чем экспрессией генов на половых хромосомах, эффект гормонов изучен и понятен гораздо в большей степени, чем прямой эффект генов половых хромосом. Свидетельством прямого влияния генетической составляющей служит медицинская статистика смертности детей до полового созревания, а также многочисленные примеры физиологических различий, которые часто присутствуют уже после рождения и усиливаются после полового созревания. Однако, не стоит забывать, что разделить эти два эффекта во многом невозможно: эффект половых гормонов проявляется уже в эмбриональном развитии – синтез тестостерона начинается в середине первого триместра беременности, а XY особи с нарушенным метаболизмом тестостерона фенотипически могут выглядеть как самки [93]. Даже относительно низкие уровни половых гормонов до полового созревания или во время эмбрионального развития могут оказывать значительное влияние на все системы организма. Другим косвенным свидетельством прямого воздействия генетической составляющей служат эксперименты на выделенных культурах клеток, не подвергающихся прямому воздействию циркулирующих гормонов. Однако и здесь нельзя исключить эпигенетического регуляторного эффекта гормонов до выделения культуры.

## ***2.2. Влияние пола на митохондриальные функции***

Рассматривая вклад митохондрий в половые различия, следует учитывать, что наследование митохондрий максимально поло-специфично: у млекопитающих митохондрии наследуются строго по материнской линии. Эволюционные причины этого подробно рассмотрены в обзоре [94] и, предположительно, во многом обусловлены необходимостью исключить «войну геномов» митохондрий отца и матери, что неизбежно привело бы к «эгоистичному» поведению полуавтономных органелл и падению

приспособленности организма в целом. Кроме того, это связывают с бóльшим окислительным стрессом, которому подвергаются митохондрии мужских половых клеток из-за их активного движения [94].

У людей в митохондриях кодируется только 37 генов из примерно 1000 необходимых для функционирования органеллы [95]. Нарушение взаимной «настройки» [96] ядерного и митохондриального геномов связывают с целым рядом патологий, что породило понятие «материнского проклятья» [97,98], т.е. нарушения функционирования клеток и тканей самцов в результате рассогласования работы геномов «женских» митохондрий матери и «мужского» ядра. У людей обнаружено около 500 мутаций митохондриальной ДНК, как в кодирующих, так и в некодирующих областях, так или иначе ассоциированных с различными заболеваниями [99–103]. Симметричное наследование ядерного генома от отца и матери позволяет отбору учитывать как мужские, так и женские особенности физиологии и метаболизма. Материнское же наследование митохондрий создает асимметрию: эффективный отбор возможен только по женской линии. Это не является проблемой, если признак является общим для мужчин и женщин. Но если существуют мутации, вредные только для мужчин, но не для женщин, то они будут во многом избегать отбора, если они не летальны. В первую очередь, безусловно, это будет касаться систем, связанных с мужской репродуктивной функцией [100,104,105]. В результате, в митохондриальном геноме будут накапливаться мутации, специфически воздействующие на мужской организм [97,106–110]. В свете фактов, изложенных в предыдущих разделах, можно представить, что митохондрии самок и самцов действительно работают не совсем одинаково. В таком случае предположение о наличии мутаций, вредных для самцов, но не для самок, вполне допустимо.

В эксперименте на дрозофилах, идентичных по ядерному геному, но с различными митохондриями было показано, что митохондрии сильно влияют на продолжительность жизни и старение самцов, но не самок [109]. Более того,

при сравнении митохондриальных геномов было показано, что этот фенотипический эффект связан скорее с количеством малых мутаций, распределенных по митохондриальному геному, а не с мутациями в конкретных генах. Исследование данного эффекта на млекопитающих гораздо сложнее методически. Тем не менее, на мышах с увеличенным количеством митохондриальных мутаций (из-за модифицированной митохондриальной ДНК-полимеразы) было показано среди прочих эффектов, что у самцов, но не у самок, значительно повышалось артериальное давление [111].

Это может являться причиной того, что самцы большинства видов с материнским наследованием митохондрий живут меньше, стареют раньше [98,99,102,110,112–114], а также больше подвержены различным заболеваниям из-за невозможности быстрого и адекватного отбора нейтральных (или даже позитивных) для самок митохондриальных мутаций, но вредных для самцов. На текущий момент предполагается два возможных компенсаторных механизма, снижающих влияние «материнского проклятья». Во-первых, частое близкородственное скрещивание может создать достаточное опосредованное давление на самок для отбора подобных мутаций. Второй возможный механизм включает в себя компенсаторные мутации ядерного генома, отбирающиеся в мужской популяции [110]. Именно поэтому в исследовании на дрозофилах использовались особи, имеющие строго одинаковый ядерный геном, чтобы избежать влияния этого фактора.

### **3. Физиологические изменения при беременности**

Беременность характеризуется многочисленными физиологическими изменениями, которые не ограничиваются плацентой и развивающимся плодом и затрагивают почти весь организм. Многие отклонения от нормы, которые могут наблюдаться в организме беременных, являются нормальными, и, напротив, нормальные для не беременных организмов значения могут свидетельствовать о патологии при беременности. Ниже приводится краткий анализ таких изменений с акцентом на те из них, которые наиболее сильно

затрагивают функционирование почек и развитие ОПП.

### **3.1. *Адаптации почек к беременности***

При беременности размер почек у людей увеличивается на 1-1.5 сантиметра, а общий объем почек увеличивается на 30% от нормального [81]. Физиологическое расширение почечной лоханки из-за нарушения оттока мочи встречается у 80% женщин и оказывает травмирующее влияние на почечную паренхиму. Предполагается, что эти изменения во многом связаны с механическими сжатиями мочеточников маткой, хотя эстроген, прогестерон и простагландины также могут влиять на структуру и перистальтику мочеточника [81,82].

Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) увеличивается на 40-70% в результате значительного, до 80%, увеличения тока крови через почки [83]. Это наблюдается через недели после зачатия и продолжается вплоть до середины третьего триместра, после чего СКФ начинает уменьшаться до нормального уровня. Увеличение СКФ ведет к физиологическому снижению уровней циркулирующих креатинина, мочевины и мочевой кислоты. Таким образом, нормальные для небеременного организма содержания этих веществ в крови будут повышенными в случае беременности. Несмотря на то, что протеинурия в целом не наблюдается при нормальном течении беременности, уже существующие протеинурические заболевания почек обостряются сильнее, что может быть объяснено увеличенной СКФ [84]. Беременность также характеризуется некоторыми изменениями в функциях почечных канальцев. Из-за сильного увеличения СКФ требуется усиление реабсорбции растворенных веществ, чтобы избежать их значительных потерь. При нормальном течении беременности организму удастся удерживать баланс, и выделение натрия держится на обычном уровне [85].

Уровень выделения воды так же остается на нормальном уровне, несмотря на уменьшенное осмотическое давление. Осмотический порог

высвобождения антидиуретических гормонов уменьшается (с участием hCG [86], релаксина [87] и, возможно, аквапорина-2 [88]).

Возможны появления легких форм глюкозурии и аминоацидурии при нормальном течении беременности, при отсутствии гипергликемии и заболеваний почек. Считается, что эти эффекты возникают из-за увеличенного уровня фильтрации глюкозы и аминокислот при сниженной эффективности реабсорбции.

### **3.2. Гемодинамика и сосудистая система**

Функционирование выделительной системы напрямую связано с сосудистой системой, поэтому изменения в составе крови, ее объеме и давлении оказывают серьезное влияние на почки.

На ранних стадиях беременности у человека, с 6 недели беременности до начала маточно-плацентарной циркуляции, сопротивление сосудов уменьшается [89], а емкость артерий увеличивается [90]. Эти изменения напрямую ведут к уменьшению артериального давления в среднем на 10 мм рт.ст. ниже уровня давления до беременности. Активность симпатической нервной системы усиливается, что приводит к увеличению частоты сердцебиения на 15-20% [90]. Комбинация учащенного сердцебиения и уменьшенного сопротивления сосудов ведет к сильному увеличению минутного сердечного выброса и может достигать 50% выше уровня до беременности к середине 3 триместра.

Ренин-ангиотензиновая система активируется во время беременности [91], что приводит к удержанию воды и соли в почках. Увеличение интерстициальной растяжимости почек может также усиливать способность удержания жидкости через ослабление натрийуретической реакции на почечное давление [92]. Общее содержание воды в организме увеличивается на 6-8 литров, что ведет к увеличению объемов как плазмы, так и интерстициального пространства. Увеличение объема плазмы без пропорционального увеличения количества красных кровяных телец ведет к

мягкой форме физиологической анемии [93], а также к увеличению секреции предсердного натрийуретического пептида (atrial natriuretic peptide, ANP) – гормона, ответственного за расслабление гладкой мускулатуры стенок сосудов, увеличение их просвета и уменьшение давления и сопротивления в них. Также этот гормон принимает участие в регуляции водно-электролитного обмена и метаболизма жировой ткани, снижает объем воды и концентрацию натрия в сосудистом русле.

### **3.3. Механизмы вазодилатации**

Вазодилатация — релаксация гладкой мускулатуры стенок кровеносных сосудов. Механизмы, обеспечивающие уменьшение тонуса мускулатуры сосудов во время беременности, до конца неизвестны. Показано уменьшение чувствительности сосудов к сосудосуживающим факторам, таким как ангиотензин II, норэпинефрин и вазопрессин [94]. Вероятно, за данные эффекты отвечают эстроген, прогестероны, простагландины и релаксин. Считается, что именно релаксин, по крайней мере, в исследованиях на крысах, играет наиболее важную роль в этих процессах, особенно касающихся клубочковой фильтрации и тока крови через почки [95]. Релаксин также способствует увеличению продукции эндотелина и NO (Табл.1).

**Таблица 1.** Изменения параметров сердечно-сосудистой системы при беременности

<b><i>Гемодинамические изменения</i></b>	
Объем плазмы	Увеличивается на 30-50%
Давление крови	Уменьшается примерно на 10 мм.р.с.
Минутный объем сердца	Увеличивается на 30-50%
Частота сердечных сокращений	Увеличивается на 15-20 ударов/мин
Почечный кровоток	Увеличивается на 80%
<b><i>Изменения в плазме</i></b>	

Гемоглобин	Содержание грамм/литр уменьшается на 20%
Креатинин	Уменьшается
Мочевая кислота	Уменьшается
pH	Немного увеличивается
P(CO <sub>2</sub> )	Уменьшается
Натрий	Уменьшается
Осмотическое давление	Уменьшается

### **3.4. *Несахарный диабет и беременность***

По неизвестным причинам уровень вазопрессиназы увеличен во время беременности. В редких случаях это может приводить к исчезновению циркулирующего антидиуретического гормона аргинин-вазопрессина, что ведет к повышенному выделению мочи и патологической жажде – частым проявлениям несахарного диабета. Этот синдром преходящего несахарного диабета присутствует, начиная со второго триместра, и исчезает после родов [96]. В некоторых случаях возможна гипернатриемия, что, в свою очередь, влечет к дегидратации функциональных клеток почки и их повреждение.

## **4. Классификация и эпидемиология острого почечного повреждения (ОПП)**

ОПП – клинический синдром, характеризующийся быстрым (часы, дни) снижением выделительных функций почки с сопутствующим накоплением продуктов азотистого обмена, таких как измеряемые в клинических тестах креатинин и мочевины. Другими заметными проявлениями ОПП являются накопление метаболических кислот, а также увеличение концентрации ионов калия и фосфата [97].

Термин «острое почечное повреждение» заменил принятое ранее «острая почечная недостаточность» (ОПН), чтобы акцентировать внимание на повреждении почечной ткани, которое имеет место как до проявлений

нарушения почечных функций, так и после возвращения функций к норме, оцениваемое по нормализации концентрации креатинина и мочевины в крови.

Для определения ОПП (а значит и его эпидемиологии) были разработаны несколько критериев. Главный общепринятый RIFLE (risk, injury, failure, loss, end stage/риск, повреждение, недостаточность, потеря функции, терминальная почечная недостаточность). Краткое описание данного критерия приведено в таблице 2.

**Таблица 2.** Критерии RIFLE

	<i>Скорость клубочковой фильтрации (СКФ)</i>	<i>Выделение мочи</i>
Риск	1,5-кратное увеличение концентрации креатинина или снижение СКФ >25%	Выделение мочи <0,5 мл/кг/ч в течении 6 часов
Повреждение	2-кратное увеличение концентрации креатинина или снижение СКФ >50%	Выделение мочи <0,5 мл/кг/ч в течении 12 часов
Недостаточность	3-кратное увеличение концентрации креатинина или снижение СКФ >75%; Повышение концентрации креатинина в плазме крови > 4 мг/дл, Или острое повышение >0,5 мг/дл	Выделение мочи <0,3 мл/кг/ч в течении 24 часов или анурия в течении 12 часов
Потеря функции	Полная потеря функции > 4 недели	
Терминальная почечная недостаточность	Полная потеря функции > 3 месяца	

ОПП остается крайне распространенной проблемой, поражая 13,3 миллиона человек в год, и по оценкам приводя к гибели более чем 1,7

миллиона людей в год [98]. Данная патология развивается у 20% госпитализированных тяжелых больных, а смертность от нее может достигать 60% [2,3]. Кроме того, ОПП является одним из самых частых осложнений в условиях стационара, поскольку может развиваться как осложнение на операбельное вмешательство, сепсис, травму, а также как реакция на различные нефротоксичные вещества, к которым относятся некоторые радиоcontrastные агенты, противовоспалительные и антибиотики.

Развитие ОПП – комплексный процесс, которые включает в себя работу многих систем иммунного ответа, активирующихся после первоначального повреждения. Схематически процесс можно описать следующим образом: за ишемическим повреждением следует локальная активация коагулирующих систем [99], за этим следует инфильтрация лейкоцитов [100], повреждение эндотелия [101], экспрессия молекул адгезии [102] и высвобождение цитокинов [103], что ведет к активации Toll-подобных рецепторов [104] и активации почечных вазоконстрикторных путей [105]. Эти процессы приводят к инверсии полярности (inversion of polarity) тубулярных клеток [106], потерей адгезии к базальной мембране [107] и, в конечном счете, к апоптозу [108].

#### **4.1. ОПП при беременности**

В данном разделе будут рассмотрены особенности возникновения и протекания ОПП на фоне беременности.

К факторам риска ОПП при беременности относятся гипертензия беременных, хроническая болезнь почек (ХБП), протеинурия, тромбическая микроангиопатия. Сахарный диабет при беременности увеличивает вероятность развития преэклампсии в 4 раза (а преэклампсия также увеличивает вероятность развития ОПП) и увеличивает вероятность развития ОПП. К другим факторам риска относится системная красная волчанка.

Сепсис является одним из самых значимых факторов риска ОПП при беременности. В развивающихся странах бактериоурия может встречаться в

7% беременностей и вероятность развития пиелонефрита у беременных женщин на 40% выше, чем у небеременных, что связано с описанными выше физиологическими изменениями при беременности. При этом вероятность развития ОПП вследствие пиелонефрита гораздо выше при беременности.

#### **4.2. *Этиология ОПП при беременности***

Ниже приведена классификация ОПП, предложенная Acharya A. и коллегами [109].

##### Преренальная этиология (prerenal causes)

- Относящиеся к беременности
  - Nuregemesis gravidarum (рвота беременных – ранний токсикоз)
  - Рвота из-за преэклампсии, HELLP-синдрома или острой жировой дистрофии печени
  - Кровотечения
    - Выкидыш (Missed abortion)
    - Септический аборт
    - Разрыв плаценты
    - Преждевременное отделение плаценты (Placenta previa)
    - Атония матки
    - Кровотечения вследствие хирургического вмешательства
    - Разрыв матки
    - Перфорация матки
- Не относящиеся к беременности состояния
  - Рвота инфекционной природы
  - Пиелонефрит
  - Прием диуретиков
  - Застойная сердечная недостаточность

##### Ренальная этиология (renal causes)

- Относящиеся к беременности состояния

- Острый тубулярный и корковый некрозы
  - Преэклампсия
  - HELLP-синдром
  - Острая жировая диссеминированное внутрисосудистое свёртывание дистрофии печени
  - Эмболия околоплодными водами
  - Тромбоэмболия лёгочной артерии
- Тромбические микроангиопатии
  - Гемолитический уремический синдром
  - Преэклампсия
  - HELLP-синдром
  - Острая жировая дистрофия печени
  - Диссеминированное внутрисосудистое свёртывание (ДВС-синдром)
  - Обострение существующих заболеваний клубочков
- Не относящиеся к беременности состояния
  - Острый тубулярный некроз
  - Появление новых заболеваний клубочков
  - Острый интерстициальный нефрит

#### Постренальная этиология (postrenal causes)

- Относящиеся к беременности состояния
  - Двусторонний гидронефроз
  - Травма мочеточника и мочевого пузыря при кесаревом сечении
- Не относящиеся к беременности состояния
  - Двусторонняя обструкция мочеточников вследствие камней или опухоли
  - Тубулярная обструкция (вызванная кристаллами кальция или мочевой кислоты)
  - Обструкция мочеиспускательного канала

## ОПП при трансплантации почек

- Острое отторжение
- Острый тубулярный некроз
- Острый интерстициальный нефрит, лекарственная токсичность, инфекционные заболевания (такие как цитомегаловирус)
- Послеинфекционный гломерулонефрит

Другим важным фактором развития ОПП при беременности является преэклампсия. В развитых странах до 40% случаев ОПП при беременности развивается в следствии тяжелой преэклампсии, осложненной HELLP-синдромом.

Преэклампсия – специфичный для беременности системный патологический синдром, характеризующийся приступами гипертензии и протеинурии после 20-ой недели беременности и встречающийся в 5-8% случаев беременности [110]. До сих пор единственным гарантированным лечением является прерывание беременности. Преэклампсия является наиболее частой причиной преждевременных родов, смертности плода и материнской смерти во всем мире [111]. Медицинские определения этой группы заболеваний представлены в таблице 3.

Большинство случаев преэклампсии регистрируются у здоровых, не рожавших женщин. К факторам риска относятся увеличенные интервалы между родами и осложнения при первой беременности [111–113]. В большинстве случаев заболевание проявляется при отсутствии семейной истории, но наличие ближайших родственников, подверженных синдрому, увеличивает шансы появления преэклампсии многократно [114]. Несколько проведенных масштабных геномных исследований не выявили однозначных генетических факторов риска [115,116].

<b>Таблица 3.</b> Определение и классификация заболеваний, связанных с повышенным кровяным давлением при беременности
---

Хроническая гипертензия	Гипертензия, зарегистрированная до 20-ой недели беременности
Гипертензия при беременности	Не наблюдавшаяся ранее гипертензия, без протеинурии, возникшая после 20-ой недели беременности
Преэклампсия	Гипертензия (давление более 140/90), не наблюдавшаяся ранее Протеинурия (выделение свыше 300 мг белка в сутки)
Тяжелая преэклампсия	Преэклампсия с одним или более из следующих факторов: Кровяное давление свыше 160/110 в покое Выделение свыше 5 г белка за сутки Уменьшенное выделение мочи (менее 500 мл за 24 часа) Головные боли, заметное беспокойство Отек легких или цианоз Повреждение гепатоцитов (выражается в повышении содержания трансаминазы) Пониженное содержание тромбоцитов в крови Задержка роста плода Инсульт
Эклампсия	Судороги на фоне преэклампсии

С преэклампсией ассоциированы такие факторы как гипертензия, сахарный диабет, заболевания почек, ожирение и антифосфолипидный синдром. Ни один из этих факторов риска до конца не объяснен, но они помогают создать определенную картину патологии [117]. Отношения рисков (ОР) (отношение риска развития заболевания у подверженных фактору группы к контрольной группе) для главных факторов, ассоциированных с преэклампсией, представлены в таблице 4.

Раньше считалось, что все последствия преэклампсии исчезают после родов, однако эпидемиологические исследования показали, что это не так. Женщины, которые перенесли преэклампсию во время беременности, гораздо более подвержены риску развития гипертензии (OR=13.9) [118] и сахарного диабета (OR=2) [119]. Удваиваются риски сопутствующих заболеваний, таких как ишемические заболевания сердца, инсультов, смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [120,121]. В большом исследовании, включавшем данные более чем о 570000 женщинах, показано, что преэклампсия увеличивает риски терминальной стадии почечной недостаточности в 5 раз [122].

<b>Таблица 4. Главные факторы риска преэклампсии</b>	
Фактор риска	Отношение рисков (OR)
Антифосфолипидный синдром	9,7 [123]
Заболевания почек	7,8 [124]
Предшествующая преэклампсия	7,2 [123]
Первая беременность	5,4 [125]
Хроническая гипертензия	3,8 [126]
Сахарный диабет	3,6 [123]
Высотность (свыше 3000 м.)	3,6 [127]
Множественная беременность	3,5 [128]
Сердечно-сосудистые заболевания в семье	3,2 [129]
Системная красная волчанка	3,0 [130]
Ожирение	2,5 [131]
Преэклампсия в семейной истории	2,3-2,6 [114]
Возраст матери свыше 40 лет	1,7 [123]
Высокий вес плода	1,88 [132]

Есть данные о том, что у детей, чьи матери страдали от преэклампсии во время беременности, снижен вес при рождении, а также повышена вероятность гипертензии, диабета, сердечнососудистых заболеваний и

хронических заболеваний почек позднее в жизни. Предположительно, это связано с уменьшением количества нефронов [133].

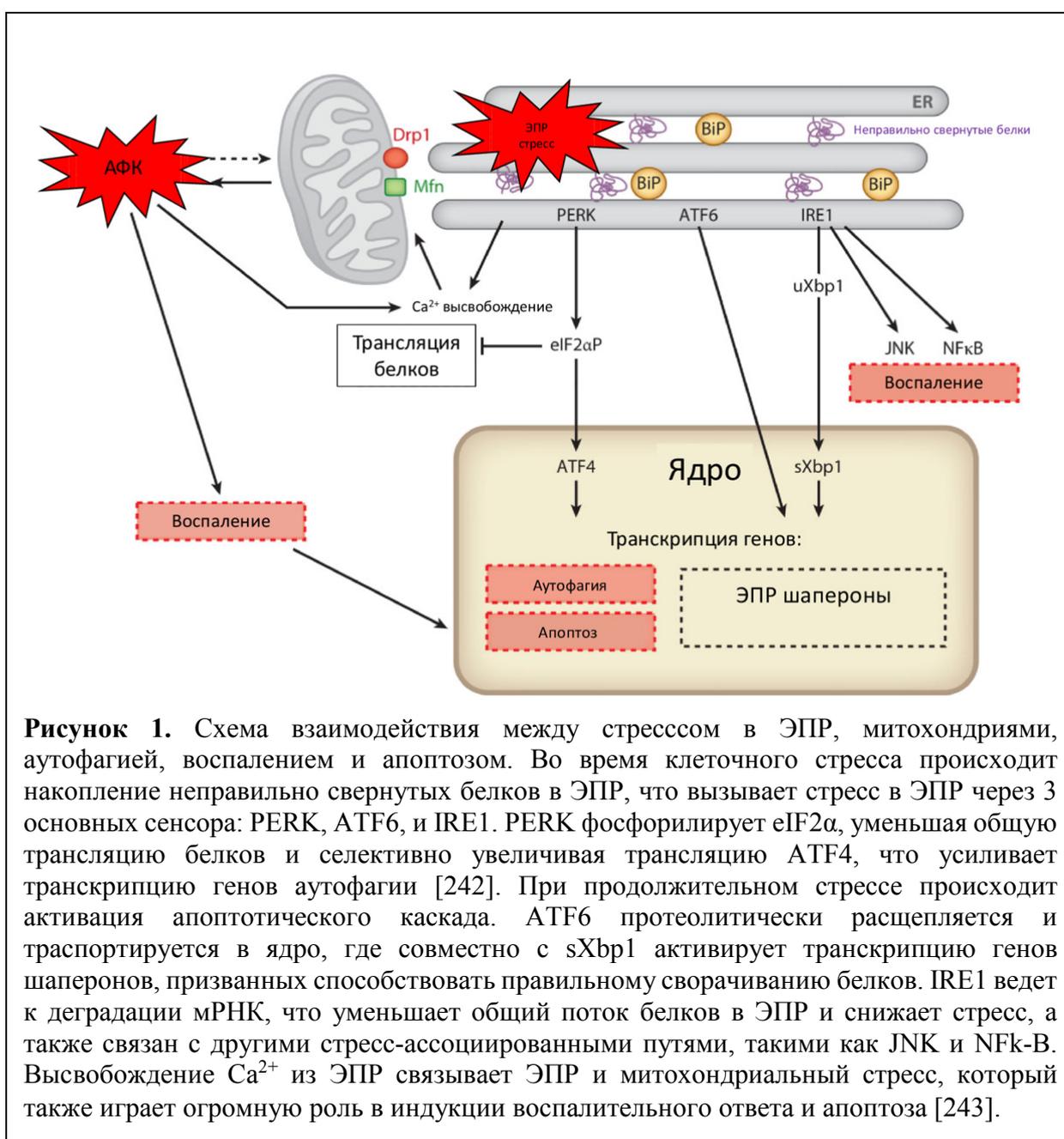
### **4.3. Механизмы развития ОПП**

#### *4.3.1. Сосудистая система*

Одну из ключевых ролей в развитии ОПП играет повреждение капилляров и сосудов в ткани почки. Почка является органом с высоким потреблением энергии, за счет осуществления энергозависимого активного транспорта. Кроме того, от давления в клубочках напрямую зависит фильтрация веществ. В нормальных условиях кровотока в почке крайне тонко отрегулирован, обеспечивая необходимое давление в капиллярах, а также необходимый уровень кислорода и питательных веществ для функционирования митохондрий, производящих АТФ, необходимый для собственно активного транспорта, а также ключевые для регуляции и поддержания функции почек NO и АФК [134]. При повреждении, функционирование митохондрий нарушается, что приводит к дисбалансу потребления кислорода, производства АТФ, АФК и NO. В контексте сосудистой системы это приводит к прямому повреждению эндотелия сосудов избыточными АФК, экспрессией на поверхности эндотелия маркеров адгезии для лейкоцитов и прочих провоспалительных маркеров. Дисфункция митохондрий также приводит к нарушению регуляции сопротивления сосудов из-за изменения концентрации NO, что ведет к еще большему повреждению эндотелия по принципу петли положительной обратной связи [135]. В конечном счете, это приводит к нарушению целостности эндотелия, а также к окклюзии капилляров, вызванной провоспалительными простагландинами и АФК, что дальше отягчает изначальное повреждение. В долгосрочной перспективе эти изменения ведут к снижению плотности сосудов в органе, а также снижению продукции VEGF и повышению продукции TGF- $\beta$ , провоцирующих развитие фиброза [136].

### 4.3.2. Стресс в ЭПР

Во время стресса нарушается процесс созревания белков, что приводит к накоплению несвернутых/неправильно свернутых белков в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), и вызывает клеточный ответ [137]. В острой фазе этот ответ носит адаптивный характер и призван восстановить клеточный гомеостаз: 1) снижается трансляция белков, чтобы уменьшить нагрузку на ЭПР, 2) увеличивается экспрессия белков-шаперонов, что увеличивает способность ЭПР к сворачиванию белков, 3) усиливаются



**Рисунок 1.** Схема взаимодействия между стрессом в ЭПР, митохондриями, аутофагией, воспалением и апоптозом. Во время клеточного стресса происходит накопление неправильно свернутых белков в ЭПР, что вызывает стресс в ЭПР через 3 основных сенсора: PERK, ATF6, и IRE1. PERK фосфорилирует eIF2 $\alpha$ , уменьшая общую трансляцию белков и селективно увеличивая трансляцию ATF4, что усиливает транскрипцию генов аутофагии [242]. При продолжительном стрессе происходит активация апоптотического каскада. ATF6 протеолитически расщепляется и транспортируется в ядро, где совместно с sXbp1 активирует транскрипцию генов шаперонов, призванных способствовать правильному сворачиванию белков. IRE1 ведет к деградации мРНК, что уменьшает общий поток белков в ЭПР и снижает стресс, а также связан с другими стресс-ассоциированными путями, такими как JNK и NF $\kappa$ -B. Высвобождение  $Ca^{2+}$  из ЭПР связывает ЭПР и митохондриальный стресс, который также играет огромную роль в индукции воспалительного ответа и апоптоза [243].

механизмы деградации для утилизации нефункциональных белков. Активация стресса в ЭПР показана как *in vivo*, так и *in vitro* [137–140]. Увеличение количества шаперонов, снижающих стресс в ЭПР, облегчает течение почечного повреждения [141,142]. Если стресс в ЭПР длится долгое время, то ответ на него становится дезадаптивным, приводя к апоптозу клеток, развитию фиброза, а его подавление облегчает долгосрочные последствия повреждения [143].

#### 4.3.3. Дисфункция митохондрий

ЭПР тесно связан с митохондриями многочисленными контактами, которые принято называть митохондрия-ЭПР-ассоциированной мембраной [144]. Это обеспечивает взаимосвязь митохондриального и стресса в ЭПР (Рис.1).

Митохондрии – внутриклеточные органеллы, вносящие основной вклад в обеспечение клеток энергией посредством окислительного фосфорилирования. Также митохондрии выполняют целый ряд других функций, таких как синтез различных веществ (стероидов, кортизола, гема, железо-серных кластеров), участие в регуляции редокс-гомеостаза [145–147], пролиферации, дифференцировки [148–151], и, что особенно важно в контексте нашей работы, апоптоза [152–155].

Почки – орган, осуществляющий активную работу и имеющий высокую потребность в энергетическом обеспечении, а, следовательно, крайне зависимый от функционирования митохондрий [156]. То же можно сказать и о других тканях, клетки которых активно метаболизируют – неоднократно показано, что функция митохондрий играет ключевую роль как для нормальной работы таких тканей, так и в случае патологии. Особенно это справедливо для патологий ишемического характера, поскольку ишемия приводит к ограничению клеток одновременно в субстрате для дыхания и в кислороде, и, в первую очередь, нарушает именно энергообеспечение клеток,

осуществляемое в митохондриях. И уже через это нарушение работы митохондрий развивается весь последующий каскад негативных эффектов, в конечном счете ведущий к гибели клеток, дисфункции органа и смерти организма [157].

Одним из ключевых событий в развитии ОПП является гибель клеток почки, в первую очередь, клеток канальцев, происходящая как по пути некроза, так и апоптоза [158]. Нарушение функции митохондрий в клетках канальцев, приводящее в том числе и к падению концентрации АТФ, а также к запуску сигнальных каскадов апоптоза, играет одну из ведущих, если не главную, роль в гибели клеток канальцев во время ОПП [159,160]. Особенно чувствительными к повреждению во время ОПП являются проксимальные канальцы, поскольку именно они выполняют самую энергозависимую работу в почках, обеспечивая активный транспорт различных веществ, не нуждающихся в выведении из организма, из первичной мочи обратно, и в них содержится максимальное количество митохондрий [161,162].

Митохондрии являются полуавтономной органеллой, отделенной от остальной клетки двухслойной мембраной, а также имеющую собственную кольцевую ДНК, кодирующую ряд компонентов, необходимых для выполнения функций митохондрий. Всего митохондриальный матрикс содержит несколько сотен белков, большинство из которых закодированы в ядерном геноме и транспортируются в митохондрию из цитозоля. Структура и функции митохондрий регулируются целым рядом процессов, включая контроль за репликацией митохондриальной ДНК, процессы дробления и слияния митохондрий и митофагию (процесс элиминации поврежденных митохондрий). Ниже мы рассмотрим часть из этих процессов и какой вклад их нарушение вносит в ОПП.

### *Активные формы кислорода и окислительный стресс*

Как было сказано выше, основная функция митохондрий в активно метаболизирующих клетках – производство АТФ в процессе окислительного

фосфорилирования. В контексте ОПП важно отметить, что во время этого процесса происходит большое количество окислительных реакций, в том числе в митохондриях постоянно присутствует значительное количество высоко реакционноспособных интермедиатов этих реакций, которые собирательно называют АФК. К ним относят супероксид анион радикал, перекись водорода, синглетный кислород и гидроксильный радикал [163]. Отличительной особенностью этих агентов является их высокая окислительная способность, создающая существенную угрозу для редокс-чувствительных компонентов клетки, прежде всего белков, липидов и нуклеиновых кислот. АФК являются не только промежуточными продуктами окислительных реакций или их побочными продуктами, но также имеют ряд регуляторных функций. Например, известно, что АФК участвуют в активации транскрипционных факторов (AP-1 и NF- $\kappa$ B) [164], индуцируют активацию рецепторов PDGF и EGF [165], а также активируют ERK/MAPK сигнальный путь [166]. В контексте данной работы нельзя не упомянуть роль АФК в ишемическом прекондиционировании. Ишемическое прекондиционирование – феномен возникающей устойчивости к ишемическому повреждению после коротких периодов ишемии. На многих органах [167,168], а также культурах [169] клеток показано, что короткие периоды ишемии, предшествующие длительной повреждающей ишемии, значительно снижают повреждение. Во время этих периодов короткой ишемии происходит увеличение продукции АФК. Если это увеличение подавить с помощью антиоксидантов, то защитный эффект прекондиционирования пропадает [169] и напротив, экзогенные оксиданты симулируют эффект прекондиционирования. Очевидно, что АФК играют важную роль в этом процессе. На текущий момент считается, что ключевой фермент данного процесса - киназа гликогенсинтазы -3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) [170].

Однако несмотря на крайне важные регуляторные функции, осуществляемые АФК, во время ишемического повреждения на первый план выходит их «химическая» составляющая как соединений, способных окислять

почти любые компоненты клеток, часто необратимо повреждая их. Это явление описывается как окислительный стресс – комплексное понятие, характеризующее дисбаланс процессов генерации и нейтрализации активных форм кислорода, в результате чего количество АФК возрастает свыше физиологических значений, и на первый план выходят их негативные эффекты. В первую очередь речь идет об окислении липидов клеточных мембран, окисление белков, в первую очередь, по остаткам тирозина, цистеина и серина, окислительное повреждение ядерной и митохондриальной ДНК, а также глобальное смещение редокс-потенциала клетки из-за окисления глутатиона и  $\text{NAD(P)H}_2$ , что так или иначе влияет почти на все клеточные процессы. АФК легко переходят из одной форму в другую. Основной образующейся формой АФК считается супероксид анион радикал  $\text{O}_2^-$ , который образуется при утечке электронов с переносчиков дыхательной цепи и при работе  $\text{NAD(P)H}$ -оксидазы и ксантинооксидазы. Однако он не стабилен и быстро дисмутирует до перекиси водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Перекись водорода довольно стабильна и способна, в отличие от других АФК, далеко распространяться в клетке от места образования, однако слабо реакционноспособна, и ей приписываются скорее сигнальные функции. Самым реакционноспособным считается гидроксильный радикал  $\text{OH}^\bullet$ , образующийся при взаимодействии двух предыдущих соединений. Как и супероксид радикал данное соединение имеет короткое время жизни (наносекунды), не может далеко диффундировать от места образования и в связи с этим маловероятно, что обладает какими-либо сигнальными функциями [171,172].

### *Регуляция апоптоза*

Митохондрии играют ключевую роль в развитии апоптоза – процесса, играющего основную роль в любых исследованиях, затрагивающих клеточную гибель. Показано, что падение митохондриального потенциала почти всегда сопровождает апоптоз [152,153], причем это характерно для любого индуктора апоптоза. Это довольно раннее событие в развитии

апоптоза и до сих пор ведутся споры, является ли это спусковым механизмом процесса или уже одним из первых шагов запущенного процесса. Одновременно с падением трансмембранного потенциала изменяется проницаемость митохондриальных мембран, что приводит к попаданию в цитоплазму внутримитохондриальных компонентов, часть из которых является апоптогенными. Считается, что для многих типов апоптоза именно нарушение барьерной функции, связанное с образованием митохондриальных мегаканалов (неспецифических пор – permeability transition pore (PTP)), является ключевым регулятором процесса апоптоза. Точный состав порового комплекса не известен, но предположительно включает в себя цитозольные белки (гексокиназа); белки наружной мембраны (зависимый от напряжения анионный канал (VDAC), периферический бензодиазепиновый рецептор PBR, порины); внутримембранные белки (креатинкиназа); по меньшей мере, один белок внутренней мембраны (аденин-нуклеотидный транслокатор) и, по меньшей мере, один белок матрикса (циклофилин D). Вероятнее всего пора как таковая образуется во внутренней мембране митохондрии [173,174], но при этом может также взаимодействовать с белками других мультипротеиновых комплексов, такими как Tim (транспортер внутренней мембраны), Tom (транспортер наружной мембраны) и Bcl-2 комплекс [175]. Имеются данные, что минимальный комплекс неспецифической поры можно воссоздать, используя VDAC, ANT и циклофилин D [176]. Считается, что митохондриальная пора интегрирует различные клеточные сигналы и «принимает решение» по совокупности факторов. В частности, показано, что пора регулируется АФК, различными ионами ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ), концентрацией протонов в матриксе, изменением трансмембранного потенциала, концентрацией нуклеотидов, редокс-статусом, концентрациями липидов и определенных пептидов, белками Bcl-2/Bcl-xL, Bid, Bax. Внутренняя мембрана митохондрий в норме не проницаема для ионов, во внешней имеется ряд каналов (например, VDAC), пропускающие молекулы до 1000 Да. При образовании неспецифической поры митохондриальные мембраны становятся

проницаемыми для веществ с массой свыше 1500 Да. Очевидным образом, открытие поры ведет к мгновенному исчезновению трансмембранного потенциала, что в свою очередь ведет к нарушению всего метаболизма митохондрий, включая синтез и импорт митохондриальных белков и синтез АТФ. Существует несколько гипотез, описывающих процесс участия поры в апоптозе. Часть исследователей предполагает, что пора проходит через обе мембраны митохондрий, позволяя белкам выходить в цитоплазму [175]. Другие авторы предполагают, что пора открывается только во внутренней мембране, что приводит к изменению баланса ионов, набуханию митохондрий и разрыву мембраны [173,177]. Так или иначе митохондриальные белки оказываются в цитоплазме. Апоптогенными из них считают цитохром *c*, апоптоз индуцирующий фактор (AIF), прокаспазы -2, -3 и -9, а также белки митохондриальных рибосом DAP3, PDCD9 [177,178]. Цитохром *c* в цитоплазме связывается с белком APAF-1, прокаспазой-9 и АТФ и инициирует апоптотический каскад каспаз [154,155,175]. Считается, что APAF-1 является координирующим белком, чья функция состоит в сближении компонентов инициирующего комплекса, в ходе чего происходит активация прокаспазы-9, которая в свою очередь воздействует на широкий круг мишеней в клетке, включая ламины ядра, поли(АДФ-рибозо)полимеразу (PARP), некоторые киназы, актин, белки цитоскелета, фактор фрагментации ДНК. В результате расщепления последнего происходит конденсация хроматина и деградация ДНК [179,180].

### *Пролиферция и дифференцировка*

Участие митохондрий в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток неоднократно описано. В первую очередь, этот аспект функций митохондрий исследован для процессов, протекающих при опухолеобразовании. Например, показано, что при онкоцитоме митохондрии могут занимать до 90% объема цитоплазмы клетки [181]. Показано, что во многих опухолях повышена экспрессия митохондриального периферического

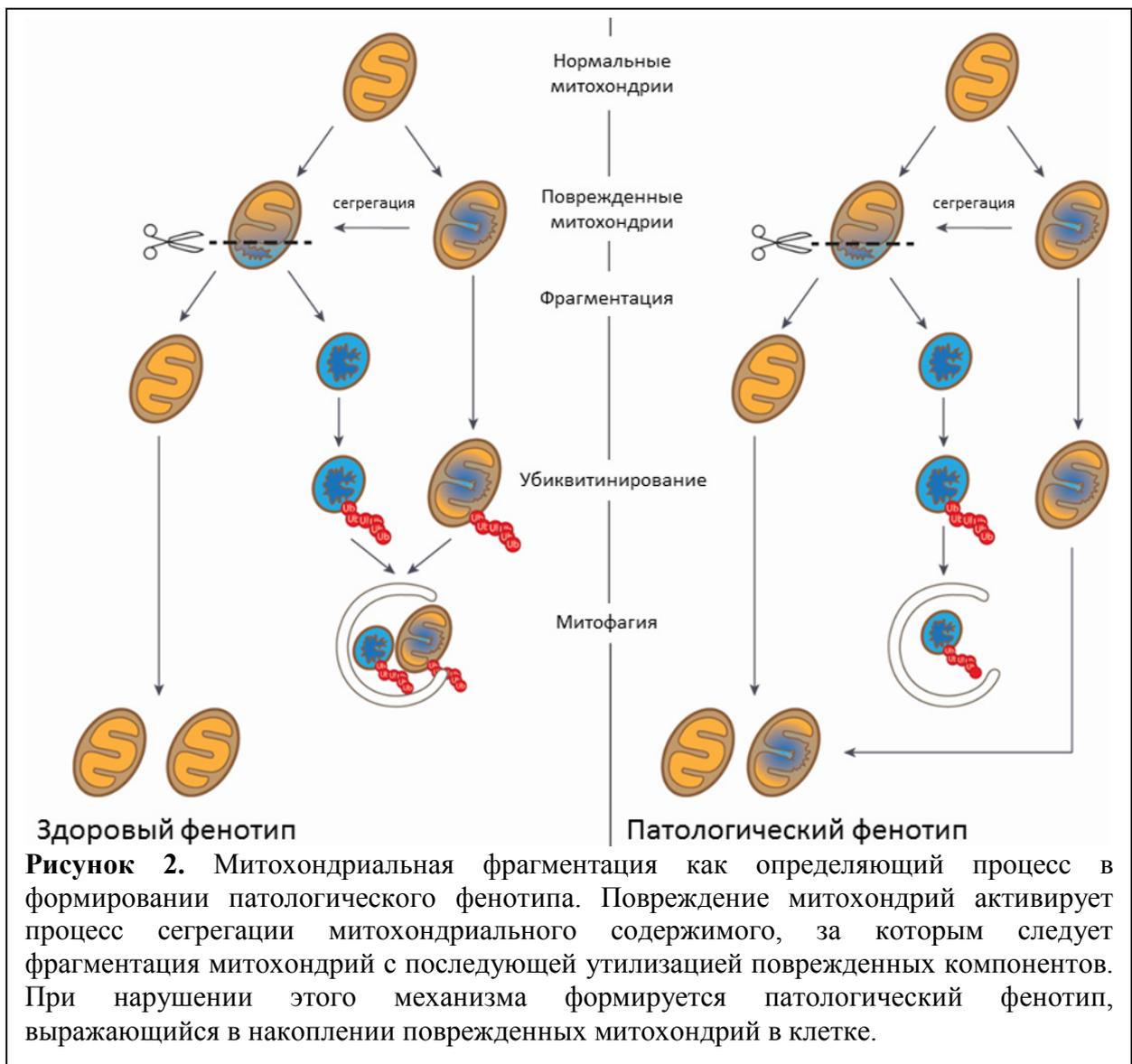
бензодиазепинового рецептора, причем уровень экспрессии коррелировал с агрессивностью метастазирования [182]. В другой работе было показано, что этот рецепт регулирует клеточный цикл [148]. С другой стороны, в митохондриях локализованы прохибитины, одна из функций которых – торможение пролиферации.

Митохондрии также сильно влияют на дифференцировку клеток. Так, было показано, что крысиные глиальные клетки-предшественники дифференцируются в олигодендроциты или астроциты при сдвиге редокс-гомеостаза в окисленную сторону и остаются недифференцированными в более восстановленных условиях [149]. В другой работе показано, что супероксид анион радикал стимулирует остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток [150].

Для многих веществ, регулирующих дифференцировку (в основном различных гормонов и факторов роста) показано, что они меняют редокс-состояние клетки, очевидно через регуляцию функций митохондрий. Например, пролиферативный ответ гладкомышечных клеток сосудов на PDGF зависит от перекиси водорода [151].

### *Гомеостаз митохондрий*

Контроль за функциями, количеством и качеством митохондрий являются ключом к поддержанию гомеостаза. Как было сказано выше, несмотря на то что митохондрии имеют собственный геном, основная часть их белковой машинерии кодируется в ядре, что предоставляет 2 точки контроля: экспрессия самих генов и импорт готовых белков в митохондрии. Биогенез митохондрий в ядре контролируется преимущественно двумя основными ядерными факторами дыхания (Nuclear respiratory factors 1 and 2, NRF1 и NRF2), которые контролируют не только синтез различных митохондриальных белков, но и регулируют, в том числе, репликацию митохондриальной ДНК [183,184].



Важнейшим этапом, обеспечивающим как поддержание популяции митохондрий в здоровом состоянии, так и борьбу с последствиями повреждений, является сочетание процессов слияния, дробления и митофагии митохондрий [162,185–189]. Митохондрии в клетке – крайне динамичные структуры, способные как собираться в огромную разветвленную сеть, так и распадаться на отдельные небольшие «зерна». Эти процессы играют ключевую роль в контроле качества митохондрий. Кратко этот процесс можно описать следующим образом (Рис.2): при наличии определенного стимула (часто им служит повреждающее воздействие) разветвленная сеть митохондрий дробится на отдельные компартменты. Каждый из них проходит «контроль качества», опирающийся, в первую очередь, на значение трансмембранного потенциала митохондрий как один из ключевых

параметров функциональной пригодности органеллы. Митохондрии, не прошедшие данный контроль, помечаются убиквитином для утилизации в аутофагосомах (процесс митофагии). Митохондрии, прошедшие контроль, могут слиться обратно в большую сеть, если это необходимо для выполнения функций в данном типе клеток. Данный процесс имеет ключевое значение во время повреждения, позволяя отбраковывать и уничтожать поврежденные митохондрии (участки митохондриальной сети), пока их дисфункция, например, нефизиологическая генерация АФК, не привела к гибели клетки. Но строгость контроля качества митохондрий также может играть ключевую роль в толерантности органа к повреждению: усиление или ослабление контроля качества может определять характеристики популяции митохондрий к моменту повреждения. Ослабленный контроль качества может приводить к тому, что на момент повреждения в клетке будет больший процент «слабых» митохондрий, которые будут более чувствительны к повреждающему воздействию, что приведет к неспособности клетки утилизировать все поврежденные митохондрии и, в конечном счете, к ее гибели. В частности, обсуждается, что при старении организма данная система контроля качества ослабляется и именно накопление поврежденных митохондрий в клетке может объяснять повышенную чувствительность старых клеток к некоторым воздействиям [190]. Важную роль митохондрий также подтверждает тот факт, что ряд генетических мутаций в митохондриальной ДНК ведут к почечным патологиям, которые характеризуются тубулопатией [191]. Показано, что PGC-1 $\alpha$ , ключевой регулятор биогенеза митохондрий, активно экспрессируется в клетках канальцев, а его сверхэкспрессия приводит к увеличению количества митохондрий, митохондриальных белков и скорости дыхания [192,193]. Более того, в ряде работ также демонстрируется, что падение уровня экспрессии PGC-1 $\alpha$  в клетках канальцев коррелирует с тяжестью ОПП, а мыши с нокаутом по этому белку гораздо более чувствительны к ОПП [194]. Это подтверждает ключевую роль функций митохондрий и митохондриального гомеостаза при ОПП. Показано, что

активация PGC-1 $\alpha$ , основного регулятора биогенеза митохондрий, уменьшает окислительный стресс, клеточную смерть и ускоряет восстановление митохондрий в клетках почек [195]. В частности показано, что это воздействие положительно сказывается на дыхании митохондрий и восстанавливает экспрессию генов электрон-транспортной цепи [194,196–198].

В других работах показано, что дисбаланс другой митохондриальной системы, отвечающей за дробление и слияние, также тесно связан с тяжестью ОПП. Показано, что как переизбыток белка Drp1, основного активатора дробления, так и недостаток белка Mfn2, медиатора слияния, приводят к повышению чувствительности клеток канальцев почек к повреждению и, в конечном счете, к их гибели. Это непосредственно влияет на тяжесть ОПП [161,199]. Митофагия также демонстрирует сильный эффект на ОПП. Сам процесс митофагии защищает клетки от повреждения, как обсуждалось выше, своевременно удаляя поврежденные митохондрии [200]. Показано, что ингибирование митофагии значительно отягчает протекание ОПП, в то время как ее индукция, напротив, оказывает защищающее воздействие [201].

Сходные работы показывают важнейшую роль аутофагии при ОПП. Этот процесс заключается в инкапсуляции поврежденных компонентов клетки в аутофагосомы, которые, в свою очередь, сливаются с лизосомами для утилизации компонентов. Если этот процесс нарушается, это ведет к большей клеточной гибели, отягчению повреждения и большей потере функций почек [201]. Напротив, усиление процесса аутофагии способствует восстановлению и регенерации ткани почки [202].

Эти данные, а также целый пласт работ, посвященных роли окислительного стресса при ишемических повреждениях [157], показывают, что митохондрии играют важнейшую роль в гомеостазе клеток канальцев почек в норме и при ОПП.

#### *4.3.4. Воспаление и дезадаптивная репарация*

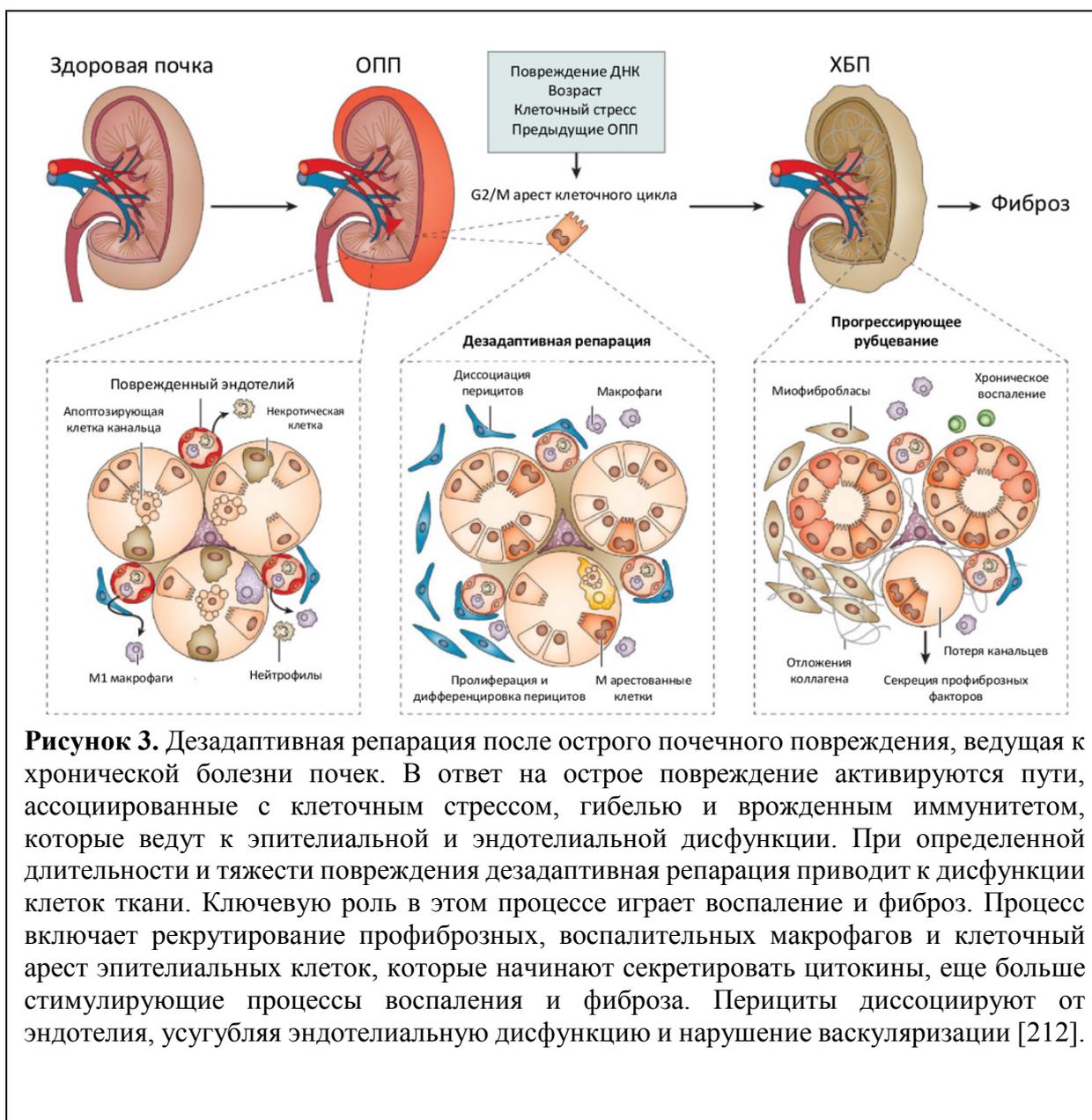
Воспаление – процесс, неизбежно возникающий в ответ на повреждение и гибель клеток. Воспаление носит дезадаптивный характер, усугубляющий изначальное повреждение и нарушающий процесс регенерации. Ключевые типы клеток, участвующие в этом процессе, – макрофаги, нейтрофилы и лейкоциты [203–205]. Считается, что в острой фазе повреждения почек, основной вклад в воспаление вносят нейтрофилы и моноциты, тогда как лимфоциты рекрутируются чуть позднее [206]. Показано, что подавление инфильтрации лейкоцитов [207], так же как и активация противовоспалительных путей, оказывает защищающее воздействие, сохраняя функцию почек и снижая структурные повреждения [208].

Вместе с повреждением активируется процесс репарации, призванный восстановить нормальное функционирование клеток, ткани и органа. В случае почек, основной вклад в замещение погибших клеток эпителия вносит пролиферация выживших эпителиальных клеток. Участие специализированных прогенеторных клеток в этом процессе, по-видимому, играет не ключевую роль [209–211]. Тем не менее, этот процесс так же, как и воспаление, может пойти по дезадаптивному пути, который, в конечном счете, приведет к дисфункции органа. Наряду с воспалением, дезадаптивная репарация являются главной причиной перехода острого повреждения в хроническое – хроническую болезнь почек [212].

Макрофаги играют ключевую роль в регуляции воспаления и образования фиброза. Показано, что количество интерстициальных макрофагов прямо коррелирует с атрофией канальцев, образованием фиброза, уменьшением плотности капиллярной сети и выживанием клеток почек [213].

Поврежденные эпителиальные клетки канальцев секретируют факторы, обеспечивающие хемотаксис макрофагов [214]. Кроме того, при нарушении дифференцировки пролиферирующего после повреждения эпителия, активируется профиброзный сигналинг, который ведет к атрофии канальцев и образованию фиброза [215]. Профиброзные и провоспалительные сигналы

вызывают арест деления и дифференцировки эпителиальных клеток канальцев, что приводит к активации пролиферации клеток соединительной ткани, которые, наряду с фибробластами, являются одними из основных источников гладко-мышечных актин-положительных миофибробластов – основных фиброзо-образующих клеток (Рис.3) [216].



**Рисунок 3.** Деадаптивная репарация после острого почечного повреждения, ведущая к хронической болезни почек. В ответ на острое повреждение активируются пути, ассоциированные с клеточным стрессом, гибелью и врожденным иммунитетом, которые ведут к эпителиальной и эндотелиальной дисфункции. При определенной длительности и тяжести повреждения деадаптивная репарация приводит к дисфункции клеток ткани. Ключевую роль в этом процессе играет воспаление и фиброз. Процесс включает рекрутирование профиброзных, воспалительных макрофагов и клеточный арест эпителиальных клеток, которые начинают секретировать цитокины, еще больше стимулирующие процессы воспаления и фиброза. Перicyты диссоциируют от эндотелия, усугубляя эндотелиальную дисфункцию и нарушение васкуляризации [212].

#### 4.3.5. Биомаркеры ОПП

Золотым стандартом определения ОПП является оценка концентрации креатинина в крови. Ключевым недостатком данного метода является то, что

он основан на оценке функции почек, а именно, на их способности секретировать креатинин. Как и многие органы, почки имеют довольно значительный запас функциональности, что приводит к тому, что концентрация креатинина значительно изменяется только при очень серьезных повреждениях. Например, при удалении одной почки вторая почка может быть способна полностью компенсировать выделение креатинина и концентрация креатинина в крови не изменится. В 2008 году FDA по результатам многолетних исследований одобрила использование 7 биомаркеров ОПП: содержание в моче KIM-1,  $\beta$ 2-микроглобулинов, цистатина С, кластерина, trefoil factor-3, альбумина, тотального белка, NGAL, IL-18, L-FABP [217]. Основными маркерами ХБП является протеинурия и микроальбуминурия.

Таким образом, просуммировав результаты литературного обзора можно сказать, что имеются свидетельства, указывающие на то, что:

1. Беременность оказывает влияние на функцию почек;
2. Почечные патологии при беременности имеют ряд особенностей;
3. Беременность усиливает регенеративные свойства организма и может защищать от ряда патологий;
4. Непосредственно протекание острого почечного повреждения при беременности крайне слабо изучено.

Это позволяет нам считать, что не только имеются теоретические основания, указывающие на то, что развитие острого повреждения почек при беременности может иметь ряд особенностей, но и что данное исследование поможет восполнить определенный пробел в фундаментальных и клинических знаниях, и его результаты будут важны не только для науки, но и для медицинской практики, в первую очередь, в сфере акушерства и гинекологии.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### *1. 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 крыс ссаживали в клетку с самцами на 2-3 дня. Затем самцов удаляли из клетки, а самки содержались в стандартных условиях последующие 19 суток. На 18 сутки забеременевших крыс отбирали для эксперимента. Такой подход позволяет достаточно точно установить срок беременности по дате возможного зачатия.

Псевдобеременность индуцировали по следующему протоколу: девственным крысам в/б инъецировали раствор человеческого хорионического гонадотропина (10 МЕ/кг) дважды с интервалом 48 часов, и после второй инъекции ссаживали 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.

## *2. Моделирование ишемии/реперфузии почки in vivo*

Для моделирования ишемической ОПП была выбрана широко применяемая в мировой практике модель унилатеральной ишемии/реперфузии (И/Р) почки. Главные достоинства данной модели – максимальная приближенность к изучаемой патологии и высокая воспроизводимость результатов.

Крыс наркотизировали хлоралгидратом (300 мг/кг внутривенно). Животное фиксировали на подогреваемом столике, выполняли разрез брюшной стенки и выделяли левую почку. 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. Правую почку удаляли. Затем циркуляцию крови возобновляли, удаляя зажим, мышечную стенку и кожу зашивали непрерывным швом викрилом 3-0. 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 для гистопатологического обследования и подвергали стандартной процедуре фиксации и гистологической окраске (см. ниже). На второй день после И/Р забрали образцы крови и почки для выделения митохондрий, определения МДА в ткани, вестерн-блоттинга. Ткани почек гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера в буфере ФСБ, содержащем 1 мМ фенилметилсульфонилфторида при 4°C. Через два месяца после И/Р почки изымались для анализа формирования фиброза.

## *3. Конфокальная микроскопия*

В данной работе была использована методика получения витальных срезов почечной паренхимальной ткани и микроскопического изучения физиологических реакций живых клеток срезов. 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 аргоновый лазер (полоса излучения 488 нм) и HeNe лазер (полоса излучения 543 нм), флуоресцентное излучение проходило через систему стандартных запирающих фильтров. Изображение получали с помощью компьютера путем усреднения результатов четырех сканирований. Скорость сканирования, уровень усиления сигнала и разрешение получаемого изображения были одинаковы для всех экспериментов каждой серии. Толщина конфокальной плоскости составляла 1,5 мкм.

#### *4. Оценка состояния митохондрий в клетках почки*

Митохондриальный трансмембранный потенциал  $\Delta\psi$  может быть оценен в живых клетках при помощи потенциал-чувствительного зонда - этилового эфира тетраметилродамина (TMRE). Этот краситель имеет липофильную монокатионную структуру с делокализованным зарядом, благодаря которому он проникает через митохондриальные мембраны в матрикс в соответствии с  $\Delta\psi$  на внутренней мембране митохондрий. При нормальной энергизации митохондрий возникающая разница концентраций TMRE между цитоплазмой и митохондриями достигает нескольких порядков и обеспечивает четкую визуализацию отдельных митохондрий.

Полученные по описанной выше методике срезы корковой зоны почки окрашивали TMRE непосредственно после получения. Срезы инкубировали в течение 10 мин при 25°C в среде инкубации, содержащей 1 мкМ TMRE. Затем срезы отмывали чистой средой инкубации от излишков TMRE в течение 5 мин

и помещали в пластиковую чашку Петри со стеклянной вставкой в дне, что обеспечивает возможность приближения объектива конфокального микроскопа к образцу на фокусное расстояние. Флуоресценцию TMRE детектировали с помощью конфокального микроскопа при длине волны возбуждения 543 нм.

#### *5. Оценка продукции активных форм кислорода*

Образование активных форм кислорода детектировалось с помощью 2,7-дихлорфлуоресцеина (Calbiochem, 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 мкМ 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. Флуоресценцию DCF детектировали с помощью конфокального микроскопа при длине волны возбуждения 488 нм.

#### *6. Оценка продукции NO*

Образование оксида азота исследовали с помощью 4,5-диаминофлуоресцеина в виде диацетатного эфира (DAF-2 DA, Calbiochem, США). После проникновения в клетки из DAF-2 DA с помощью клеточных эстераз образуется DAF-2, который при взаимодействии с оксидом азота образует флуоресцирующий продукт.

Для выявления продукции NO в клетках почки, срезы инкубировали в течение 10 мин при 25°C в среде инкубации, содержащей 10 мкМ DAF-2 DA, затем срезы отмывали чистой средой инкубации в течение 5 мин и помещали срезы в пластиковую чашку Петри со стеклянной вставкой в дне. Флуоресценцию DAF-2 детектировали с помощью конфокального микроскопа при длине волны возбуждения 488 нм.

### *7. Определение концентрации МДА*

Концентрацию МДА в гомогенате почки определяли с использованием теста тиобарбитуровой кислоты, как описано в [218]. Почку извлекали, почечную капсулу удаляли, ткань размельчали ножницами и гомогенизировали в 3 мл буфера (1,15% KCl, 0,38% EDTA) при 4°C. К гомогенату добавляли 0,8% раствор тиобарбитуровой кислоты и 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> в соотношении 1 : 1,1 : 3,3, соответственно. Смесь инкубировали 40 минут при 100°C, после чего центрифугировали 5 мин на 14000 об/мин. Супернатант отбирали и измеряли его оптическую плотность при длине волны 532 нм на спектрофотометре Hitachi-557. Результаты нормировали на концентрацию белка.

### *8. Определение концентрации эритропоэтина*

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 концентратах анализировалась концентрация эритропоэтина с помощью иммуноферментного набора ELISA Quantikine® в соответствии с инструкциями производителя (R & D Systems, США).

### *9. MTT тест*

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью широко используемого 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 ДМСО на лунку и измеряли оптическую плотность при 540 нм с помощью планшетного спектрофотометра Zenyth (Anthos Labtec, Австрия).

## *10. Гистология почек*

На определенных сроках у животных забирали почки и немедленно после выделения фиксировали в 10% -ном нейтральном буферном растворе формалина и после стандартной проводки заливали в парафин. С помощью микротомы делали срезы толщиной 5 мкм, разрезали, депарафинировали, гидратировали и окрашивали гематоксилин/эозином или пикрофуксином. Срезы исследовали на острый тубулярный некроз слепым способом. Для измерения фиброза определяли процент положительной на фиброз площади среза в почках всех исследуемых животных с использованием плагина «Color threshold» программы Fiji [219]. Фиброзную ткань идентифицировали на основании цвета, настраивая цветовой порог для каждого изображения. Было исследовано не менее семи полей зрения для каждого среза.

## *11. Эксперименты на первичной культуре клеток почечного эпителия*

У взрослых крыс асептически удаляли почки, которые измельчали и помещали в сбалансированный буферный солевой раствор Хенкса, pH 7,4. После отмывки ткань помещали в 0,1% раствор коллагеназы в растворе Хенкса и инкубировали в течение 30 минут при 37°C, удаляли крупные куски ткани, а супернатант центрифугировали при 200g в течение 3 минут. Осадок клеток ресуспендировали в среде DMEM/F12 (1:1), суспензию клеток оставляли в пробирке на 10-12 мин, после чего отбирали осадок, в котором содержались почечные канальцы. Клетки культивировали в среде, содержащей DMEM/F12 с 10%-ной эмбриональной бычьей сывороткой EGF (10 нг/мл). Ишемию моделировали в растворе Хенкса путем его продувания азотом для создания анакисических условий. Клетки инкубировали в анакисичном растворе 24 часа при 37°C, затем раствор заменяли на стандартную питательную среду, индуцируя реоксигенацию. Для оценки трансмембранного потенциала митохондрий клетки инкубировали в течение 30 мин с этиловым эфиром тетраметилродамина (TMRE, 200 nM). Изображения были получены с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM510

(объектив с масляной иммерсией Plan-Neofluar 63x/1.25 Oil, возбуждение при 543 нм, эмиссия в диапазоне 560-590 нм).

### *12. Мониторинг пролиферации клеток в реальном времени*

Анализ кинетики роста клеток проводили с использованием прибора RTCA iCELLigence™ (ACEA, Сан-Диего, США). Этот метод подробно описан [220]. Метод основан на использовании электрического сопротивления электродов, покрытых клетками. Метод был первоначально введен в 1984 году [221,222] и использовался для различных исследований клеточной пролиферации, жизнеспособности, адгезии и миграции [220,223–225]. Инструмент iCELLigence RTCA помещали в инкубатор при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки высевали на 8-луночные планшеты с микроэлектродами. Через 24 часа после этого среда заменялась, чтобы избавиться от неприкрепленных и мертвых клеток. Еще через 24 часа клетки подвергали воздействию 17-часовой КГД: среду заменяли на забуференный фосфатом физиологический раствор Дульбекко, а кислород заменяли на N<sub>2</sub> в мультигазовом инкубаторе Galaxy 170R (Eppendorf/NewBrunswick, UK). После КГД среду заменяли на описанную выше культуральную среду и нормальную концентрацию O<sub>2</sub>.

### *13. Выделение митохондрий*

Митохондрии почек крысы выделяли дифференциальным центрифугированием, по методу описанному ранее в [226]. Все процедуры проводились в условиях охлаждения при 4°C. После извлечения почки немедленно помещали в охлажденную (2°C) среду выделения CB1: 0,25 М сахара, 10 мМ HEPES, pH 7,5, 1 мМ ЭГТА, 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Капсула, покрывающая почки, и почечная лоханка удалялись. Почки измельчали на 2-4 мм фрагменты и дважды промывали холодной средой выделения. Гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера (стекло-тефлон) 1 минуту при 4°C. Объем гомогената довели до 40 мл и центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин на центрифуге Beckman J 2-21,

ротор JA-20. Супернатант фильтровали через 4 слоя марли, для отделения липидной фракции, и центрифуговали 10 минут при 10000 об/ мин. Осадок суспендировали в среде выделения СВ2, не содержащей БСА и ЭГТА, в объеме около 40 мл, и осаждали в течение 10 мин при 12000 g. Полученный осадок тщательно суспендировали. Содержание белка, определенное с помощью бицинхониновой кислоты, составляло от 20 до 30 мг/мл.

#### *14. Проточная цитометрия*

Проточную цитометрию суспензии митохондрий проводили с использованием Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Интенсивность флуоресценции TMRE, отражающая величину трансмембранного потенциала, была измерена в FL2-канале с  $\lambda_{ex} = 488$  нм. Инкубационная среда содержала 120 mM KCl, 3 mM HEPES, 1 mM EGTA, 5 mM  $K_2PO_4$ , 100 нМ TMRE, 5 mM сукцинат и 200 мкг митохондриального белка/мл, pH 7,4. Данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowIT и Microsoft Excel.

#### *15. Вестерн-блоттинг*

После извлечения почки быстро охлаждались в ФСБ. Почечная лоханка и капсула удалялись, почку измельчали на фрагменты и затем гомогенизировали в четырехкратном объеме ФСБ, содержащем 1 mM ингибитора протеаз PMSF. Полученный гомогенат центрифугировали при 3000 об./мин в течение 3 минут, супернатант смешивали с 4-кратным буфером для образцов, содержащем 0,125 M 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. Аликвоту супернатанта использовали для определения концентрации общего белка с помощью коммерческого набора на основе бицинхониновой кислоты (Sigma, США). Содержание белка в образце

определяли с помощью стандартных растворов БСА. На каждую дорожку в геле наносили количество образца, соответствующее 10 мкг общего белка.

Электрофорез белков проводили в псевдоградиентном (10-15-20%) полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по Лэммли [162]. Трис-глициновый электродный буфер содержал 25 мМ Трис-НСl, 192 мМ глицина, 0,1% додецилсульфата натрия, рН 8,3. Электрофорез проводили при постоянном токе 20 мА и максимальном напряжении 200 В. По окончании электрофореза белки переносили на PVDF мембрану (Amersham Pharmacia Biotech, Rainham, UK) согласно стандартной методике. Перенос проводили полусухим методом в течение 45 минут при 300 мА, 25 В (время могло варьировать в зависимости от размера целевого детектируемого белка). Качество переноса оценивали визуально по переносу окрашенных маркеров. Мембраны блокировали 5%-ным обезжиренным молоком в ФСБ/0,1% Tween-20 в течение 1,5 часов, затем промывали ФСБ 3 раза по 10 мин и инкубировали ночь при температуре 4°C с первичными антителами в ФСБ, содержащем 0,1% БСА (фракция V, fatty acids free, Calbiochem) и 0,05% Tween-20. Первичные антитела добавляли в следующих разведениях: против PCNA 1:1000 (ab13110, CellSignaling, США), GDF11 – 1:500 (ab124721, Abcam, США), NGAL (липокалин 2) – 1:1000 (ab63929, Abcam, USA), pGSK3 $\beta$  – 1:1000 (9336, CellSignaling, США), GSK3  $\alpha/\beta$  – 1:1000 (sc7291, Santa Cruz Biotech, США), VEGF – 1:1000 (07-1376, Millipore, США). Мембраны отмывали три раза по 5 мин в ФСБ, содержащем 0,05% Tween-20. Далее мембраны инкубировали в течение часа с вторичными антителами против мышинных или против кроличьих антител IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена, разведение 1:10000 (ИМТЕК, Россия). После финальной отмывки от несвязанных антител, полосы детектировали с помощью хемилюминесцентного субстрата пероксидазы хрена ECL (Enhanced chemiluminescence system, Amersham Pharmacia Biotech). Хемилюминесценция детектировалась прибором ChemiDoc MP ImagingSystem (Bio-Rad, США), после чего изображения анализировали с помощью программы ImageLab.

## *16. Оценка количества карбонилированных белков*

При окислительном стрессе происходит патологическая модификация белков клетки путем присоединения карбонильной группы, в результате по количеству карбонилированных белков которых можно судить о степени окислительного повреждения белков и общем редокс статусе клетки. Уровень карбонилирования белков определялся с помощью коммерческого набора Oxyblot™ (Millipore, США) согласно протоколу производителя. 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 сшивался с карбонильными группами в виде DNP-гидразона, в течение 15 минут. Дальнейший протокол работы совпадал с проведением вестерн-блоттинга, использовались коммерческие первичные антитела на DNP-остатки на белках.

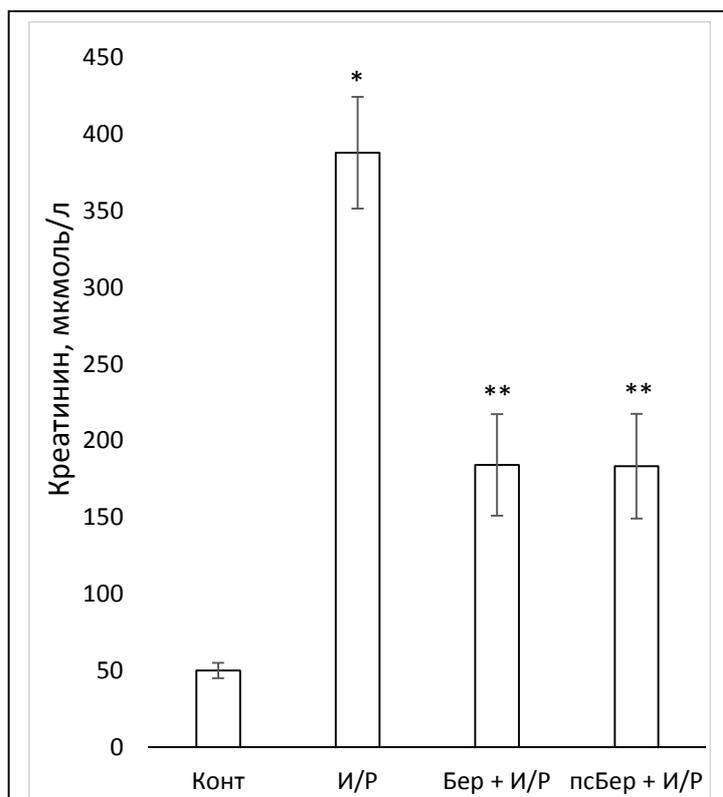
## *17. Статистический анализ*

Статистический анализ проводился в программе Microsoft Excel, за исключением случаев отсутствия необходимых статистических функций. Для оценки изменения параметров крыс во времени использовались 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, требующий размера выборки больше 3. 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). Уровень значимости для обоих критериев был выбран на уровне 0,01. При необходимости множественных сравнений использовалась поправка Бонферрони.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### 1. Острое почечное повреждение при ишемии у беременных и контрольных самок

Для моделирования острого почечного повреждения была использована описанная ранее модель ишемии/реперфузии почки с сопутствующей нефрэктомией второй почки. Тяжесть почечной дисфункции оценивали с использованием двух классических биохимических маркеров почечной



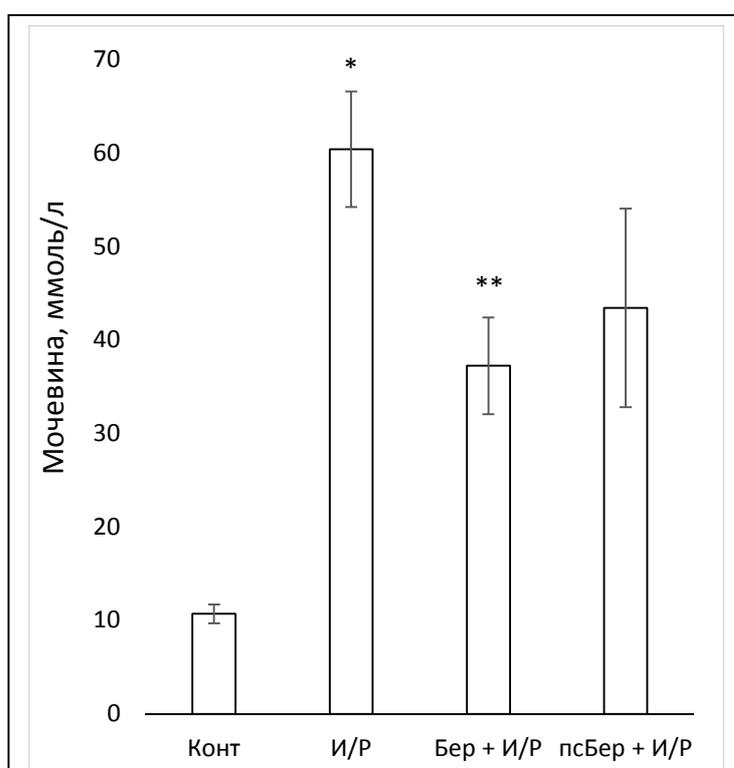
**Рисунок 4.** Дисфункция почек через 48 часов после И/Р, оцененная по повышению концентрации креатинина в плазме крови (мкмоль/л) у небеременных (И/Р, n=10), беременных (Бер + И/Р, n= 10) и псевдобеременных (псБер + И/Р, n=8) животных, подвергшихся И/Р почки. В качестве контроля (Конт, n=10) использованы ложнооперированные животные. \*p < 0.05 по сравнению с контролем, \*\*p < 0.05 по сравнению с И/Р.

недостаточности: концентрации креатинина и концентрации мочевины в крови. Они являются продуктами азотистого обмена, выводимыми почками, и, таким образом, повышение их концентрации в крови говорит о том, что функция почек нарушена, и их выведение не обеспечивается в должной мере. Концентрация креатинина в крови через 48 часов после И/Р увеличивалась у небеременных животных в 4 раза и достигала 388±36 мкмоль/л (Рис.4), по сравнению со значениями в крови контрольных животных 50±4 мкмоль/л. Это демонстрирует, что И/Р почки ведет к

значительным функциональным нарушениям работы почек. Беременность или гормональная псевдобеременность животных оказывали выраженный защитный эффект при И/Р почки, поскольку при этом значимо снижалась

концентрация креатинина в крови (до  $184\pm 33$  и  $183\pm 34$  ммоль/л, соответственно), по сравнению с небеременными животными. Аналогичные результаты демонстрирует и второй клинический маркер функции почек – концентрация мочевины в сыворотке крови (Рис.5): И/Р вызывает шестикратное увеличение концентрации мочевины в крови (с  $10\pm 1$  до  $60\pm 6$  ммоль/л), а беременность и псевдобеременность заметно уменьшают количество этого метаболита ( $37\pm 5$  и  $43\pm 10$  ммоль/л, соответственно). Это свидетельствует о том, что беременность и псевдобеременность обеспечивают значительную защиту функций почек при остром ишемическом почечном повреждении.

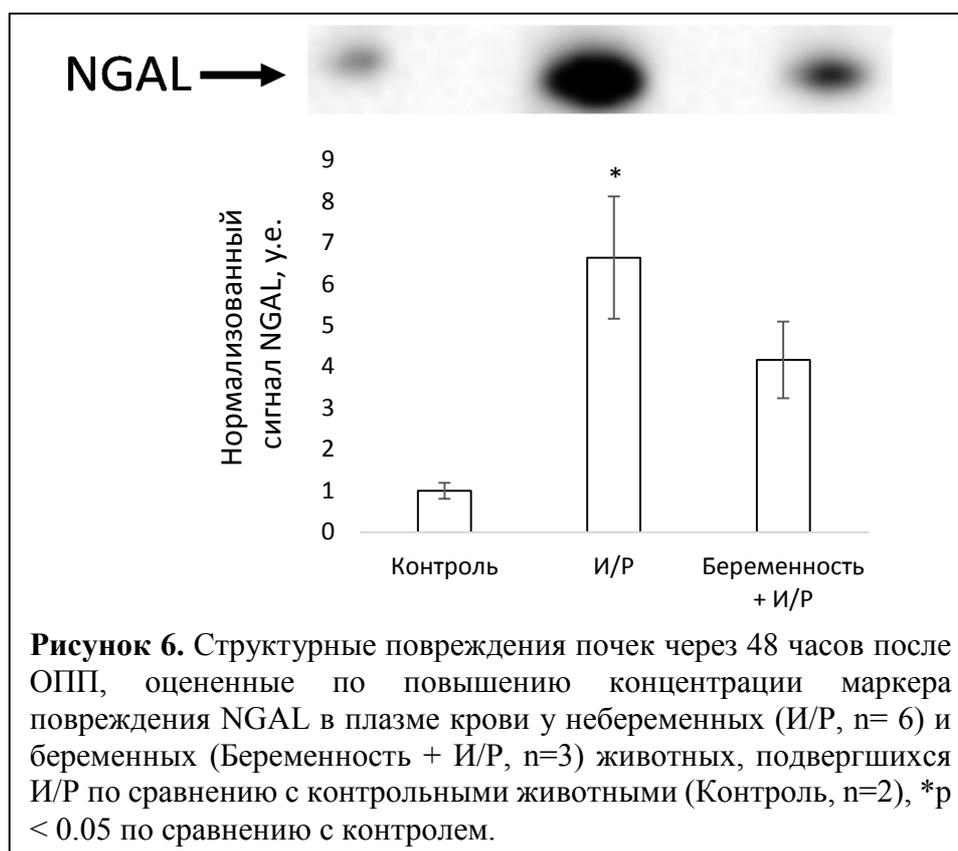
Для оценки повреждения ткани почек использовался новый маркер, который в последнее время активно используется как в экспериментальных исследованиях, так и в клинической практике – NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов). Повышение NGAL отражает острое повреждение почек на ранних стадиях его возникновения, даже если функциональный дефицит



**Рисунок 5.** Дисфункция почек через 48 часов после И/Р, оцененная по повышению концентрации мочевины в плазме крови (ммоль/л) у небеременных (И/Р, n=10), беременных (Бер + И/Р, n= 10) и псевдобеременных (псБер + И/Р, n=8) крыс, подвергшихся И/Р. В качестве контроля (Конт, n=10) использованы ложнооперированные животные. \*p < 0.05 по сравнению с контролем, \*\*p < 0.05 по сравнению с И/Р.

еще не выявляется. Через 48 часов после моделирования И/Р почки (Рис.6) в сыворотке крови небеременных животных наблюдалось семикратное увеличение концентрации NGAL по сравнению с интактными животными. У

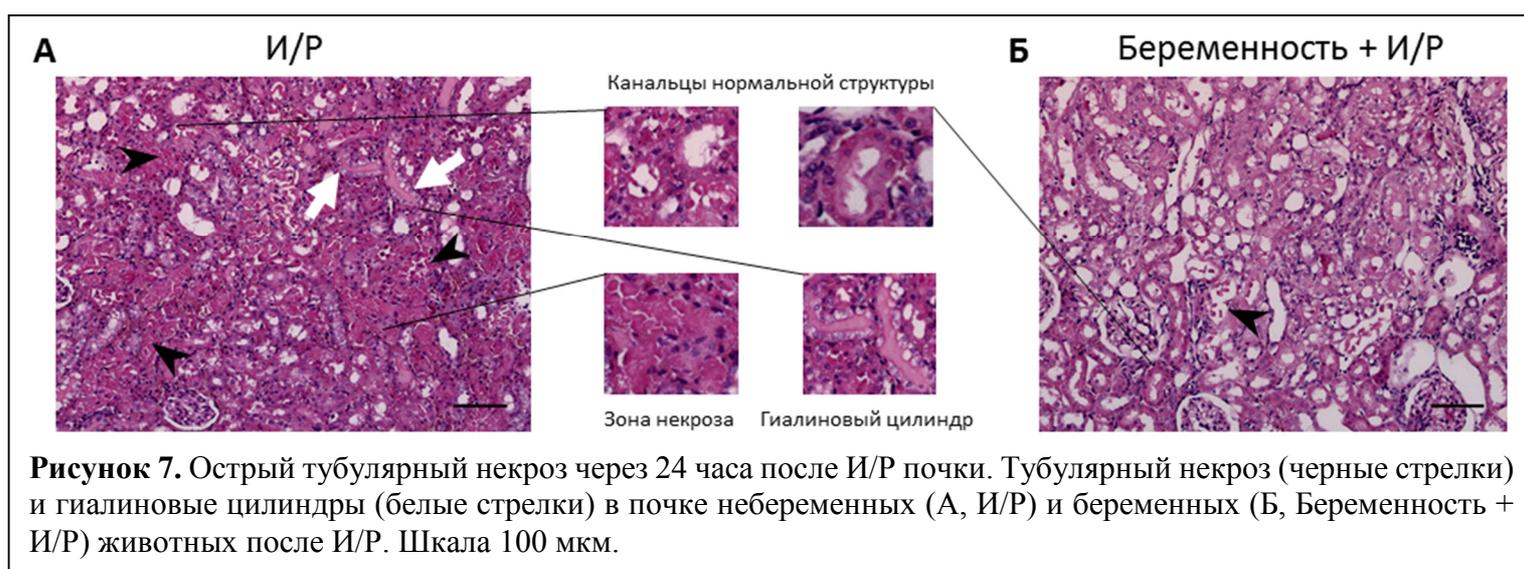
беременных животных, перенесших И/Р, концентрация NGAL в крови была на 40% ниже чем при И/Р почки у небеременных крыс. Эти данные подтверждают тот факт, что острое повреждение почек после И/Р у беременных менее выражено, чем у небеременных самок.



## 2. Влияние беременности на патоморфологические изменения после ишемии почки

Для оценки морфологических признаков повреждения тканей почек после И/Р были проведены гистологические исследования. В первую очередь оценивался острый тубулярный некроз (ОТН) – наиболее значимый патологический процесс, происходящий при остром повреждении почек. Почки для гистопатологического исследования были изъяты через 24 часа после И/Р. В корковой зоне почек небеременных животных после И/Р обнаруживаются признаки тяжелого канальцевого некроза (Рис.7), при этом зоны некротизированных канальцев занимают достаточно большие площади среза. Кроме того, наблюдается множество канальцев с десквамированным

эпителием, а также отдельные канальцы с эпителием в состоянии гидропической дистрофии. Многие канальцы дилатированы, что говорит о возможной обструкции нижележащих сегментов нефрона и ухудшении тока первичной мочи, в результате чего просвет вышележащих участков расширяется. Это предположение подтверждается наличием многочисленных гиалиновых цилиндров в просвете канальцев, которые при дальнейшем продвижении по нефрону могут препятствовать удалению мочи. В группе беременных животных после И/Р в тканях почки ОТН наблюдается значительно реже, причем он носит скорее очаговый характер, отдельные некротические клетки наблюдаются также в просвете канальцев. В целом, ткань почки сохранна, хотя в определенных полях зрения наблюдаются канальцы с десквамированным эпителием, а также эпителий в состоянии дистрофии. Дилатированные канальцы и гиалиновые цилиндры встречаются значительно реже, чем у небеременных животных после И/Р, то есть можно предположить, что обструкция нижних отделов нефрона и собирательных трубочек менее выражена. Таким образом, беременность снижает выраженность гистопатологических изменений ткани почек в острой фазе повреждения.



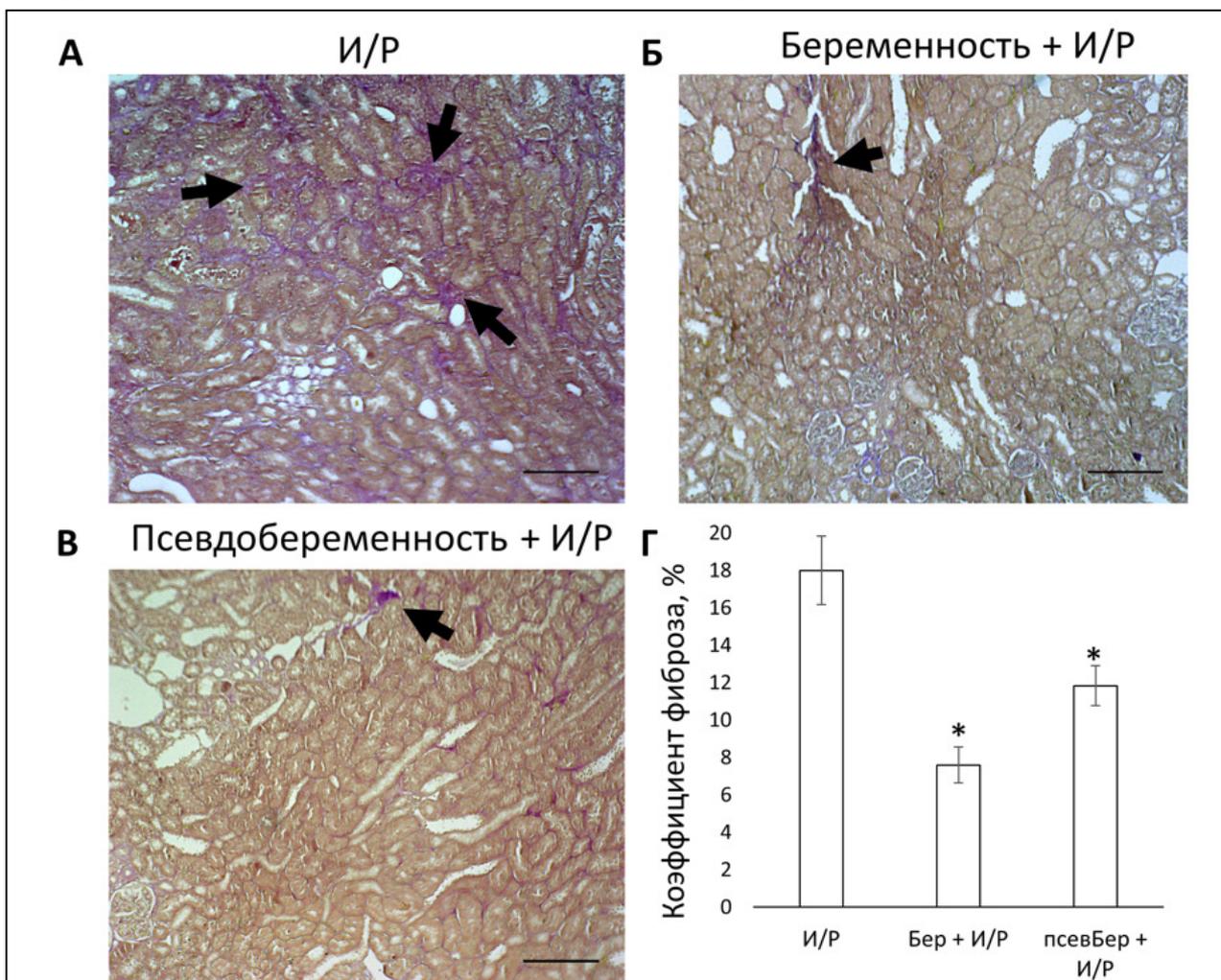
**Рисунок 7.** Острый тубулярный некроз через 24 часа после И/Р почки. Тубулярный некроз (черные стрелки) и гиалиновые цилиндры (белые стрелки) в почке небеременных (А, И/Р) и беременных (Б, Беременность + И/Р) животных после И/Р. Шкала 100 мкм.

### **3. Влияние беременности на фиброз после ишемии почки**

Для оценки долгосрочных последствий ОПШ было проведено исследование формирования фиброза на гистологических срезах почки через 2 месяца после И/Р. Наличие фиброза было оценено с помощью программных алгоритмов анализа изображений чтобы минимизировать субъективизм оценки исследователем по наличию специфически окрашенных участков ткани: коллагеновые и ретикулярные волокна при использованном типе окрашивания приобретают сине-фиолетовый цвет. Исследовалась преимущественно корковая зона почки. Было выявлено (Рис.8), что площадь, занимаемая соединительной тканью у небеременных животных, перенесших И/Р, в среднем составляет 20% от всей площади почки, а в отдельных областях среза занимает до 30%. У животных, которые на момент И/Р повреждения находились в третьем триместре беременности, средняя площадь, занимаемая рубцовой тканью, составляла 7% от всей ткани, то есть была более чем в 2 раза меньше, чем у небеременных животных, перенесших И/Р. Это значит, что при ишемии на фоне беременности меньше функциональной ткани было заменено в пост-ишемический период на нефункциональную 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 повреждения в состоянии гормональной псевдобеременности, хотя изменения и были чуть менее выраженными: в среднем 12% ткани было занято соединительной тканью, что в 1,5 раза меньше, чем у небеременных животных, перенесших И/Р. Поскольку известно, что в долгосрочной перспективе именно образование фиброза в ткани приводит к нарушению ее функций, то данные результаты говорят о том, что отдаленные последствия ишемического ОПШ, перенесенного при беременности или псевдобеременности, гораздо менее выражены, чем у небеременных животных. В качестве причин, лежащих в основе этих различий

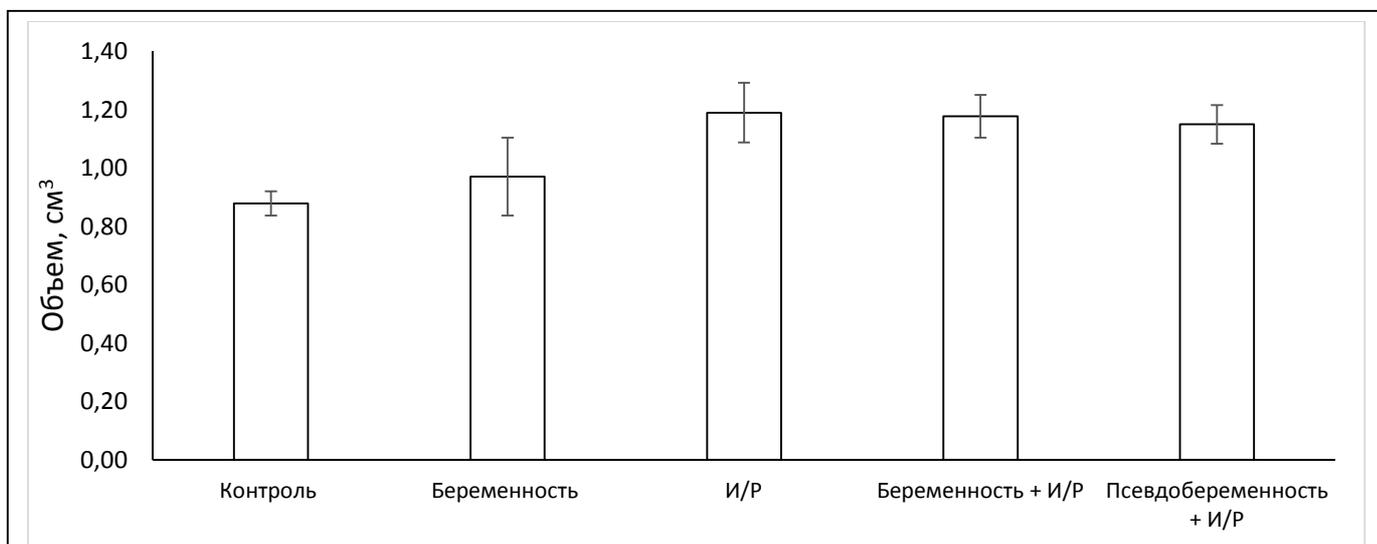
можно предположить, с одной стороны меньшую тяжесть изначального повреждения почки у беременных, а с другой стороны, усиленное течение у них регенерации и уменьшение вторичного повреждения на поздних сроках. Вклад этих механизмов был оценен в данной работе и описан в последующих разделах.

Помимо анализа морфологических изменений ткани было также проанализировано изменение объема почки (Рис.9). В отсутствие повреждения наблюдалось незначительное увеличение почки на 10% при беременности, что согласуется с литературными данными и клиническими наблюдениями. Через 2 месяца после перенесенной И/Р с параллельной нефрэктомией наблюдалось увеличение поврежденной почки на 20-30%.



**Рисунок 8.** Фиброз в тканях почек через 2 месяца после И/Р почки. Репрезентативные изображения гистологической окраски пикрофусцином срезов почек небеременных (А), беременных (Б) и псевдобеременных (В) крыс и (Г) доля фиброзной ткани, определенная при цифровом анализе гистологических изображений. Шкала 100 мкм. \* $p < 0.05$  по сравнению с И/Р.

Однако, значимых различий между животными, находившимися на момент повреждения в небеременном, беременном или псевдобеременном состоянии обнаружено не выявлено.

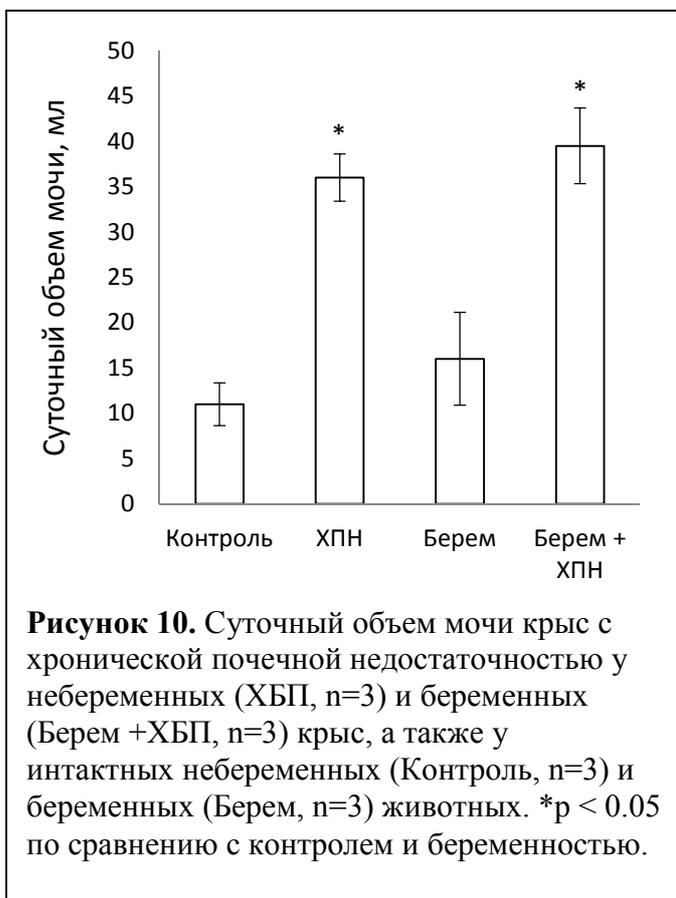


**Рисунок 9.** Объем почки у контрольных небеременных (Контроль, n=2) и беременных (Беременность, n=2) животных, а также через 2 месяца после И/Р у небеременных (И/Р, n=5), беременных (Беременность + И/Р, n=2) и псевдобеременных животных (Псевдобеременность + И/Р, n=5) крыс.

#### **4. Влияние беременности, возникшей после ОПП, на функционирование почек**

Также было исследовано, влияет ли беременность на уже имеющуюся почечную недостаточность. Для этого сравнивались интактные беременные и небеременные самки с животными, подвергшимися ишемическому повреждению почки за 2 месяца до эксперимента. Исходя из биохимического анализа крови и мочи состояние крыс через 2 месяца после И/Р можно характеризовать как компенсированную ХБП. На фоне такого состояния крыс ссаживали с самцами до возникновения беременности.

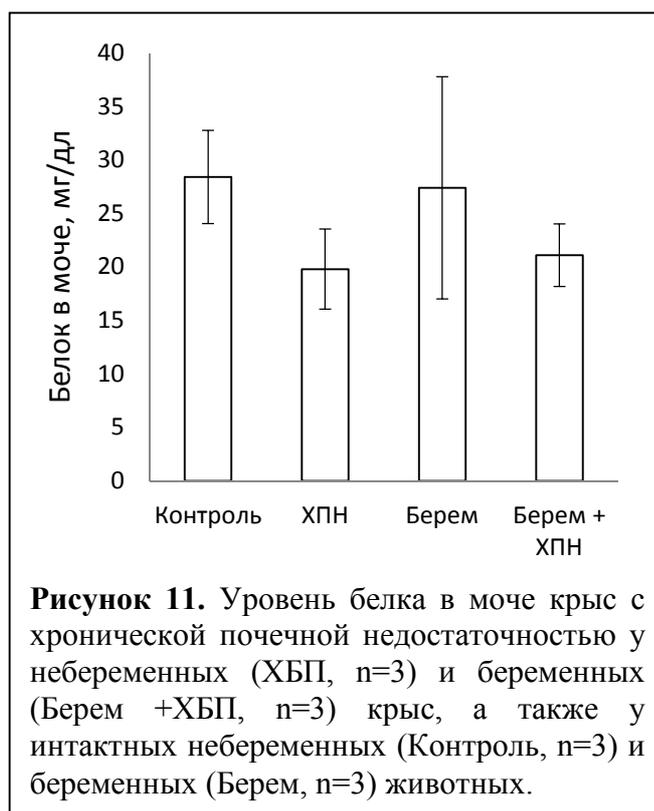
Выявлено, что перенесенная И/Р почки приводит через 2 месяца к выраженной полиурии, то есть увеличению суточного объема мочи (Рис.10): у животных через 2 месяца после И/Р суточный объем мочи увеличился в четыре раза с 10 мл до 40 мл в сутки. Это говорит об уменьшении реабсорбции воды в почечных канальцах из-за повреждения при И/Р. Однако, беременность



значимо 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 концентрации белка в моче (Рис.11) и объема мочи могут вести к заметному изменению суммарного выделения белка (Рис.12). Суточное выделение белка было повышено в два раза, с 3 мг до 6. Выявлено, что

беременность так же не повлияла на данный параметр. Таким образом, состояние почек у крыс через 2 месяца после И/Р можно охарактеризовать как первую стадию ХБП (стадия компенсации).

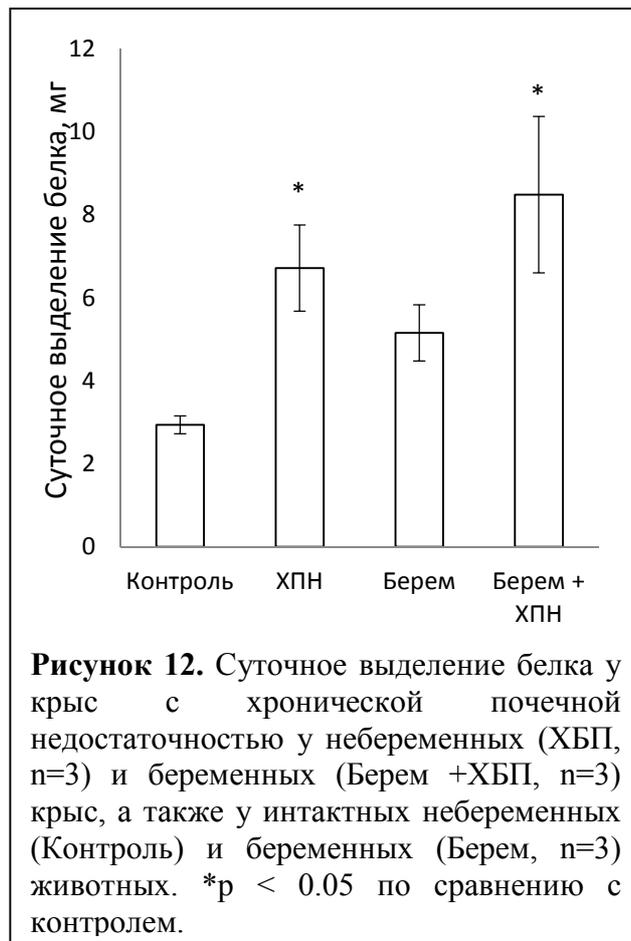
Уровень мочевины в крови у крыс, перенесших И/Р почки с правосторонней нефрэктомией, через 2 месяца после операции был незначительно выше (12 ммоль/л), чем у интактных крыс (7 ммоль/л) (Рис.13). Наступление беременности не повлияло на концентрацию мочевины в крови как у интактных животных, так и у животных, ранее подвергшихся И/Р. Сходным образом, перенесенная за 2 месяца до забора образцов ишемия вызвала



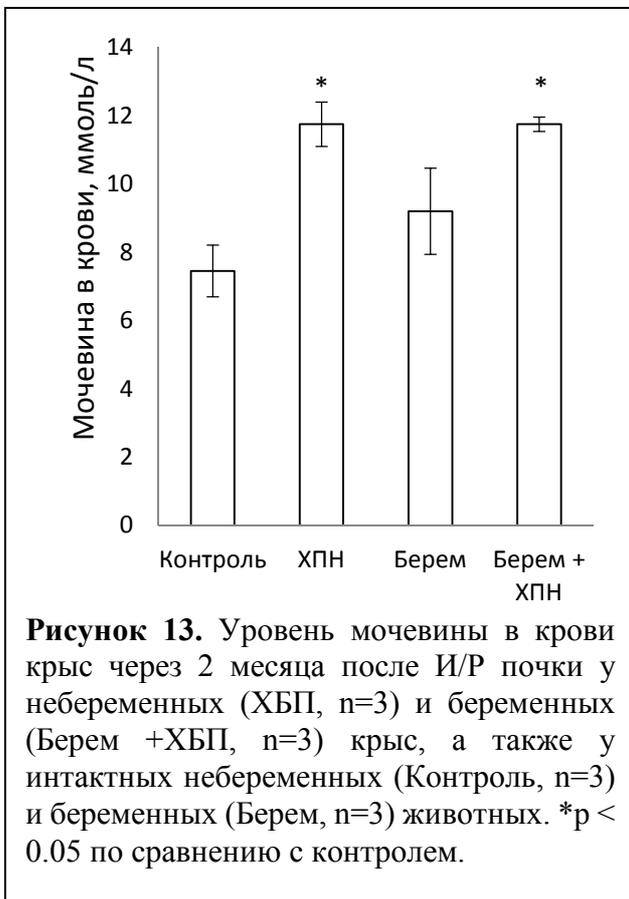
незначительное повышение содержания креатинина в крови у небеременных самок (60 мкмоль/л по сравнению с 40 мкмоль/л у интактных животных), а наступление беременности не повлиял на данный параметр (Рис.14).

Оценка концентрации креатинина в моче крыс через 2 месяца после повреждения не выявила достоверных изменений в сравнении с интактным контролем ни в одной группе (Рис.15).

Таким образом, подводя итоги

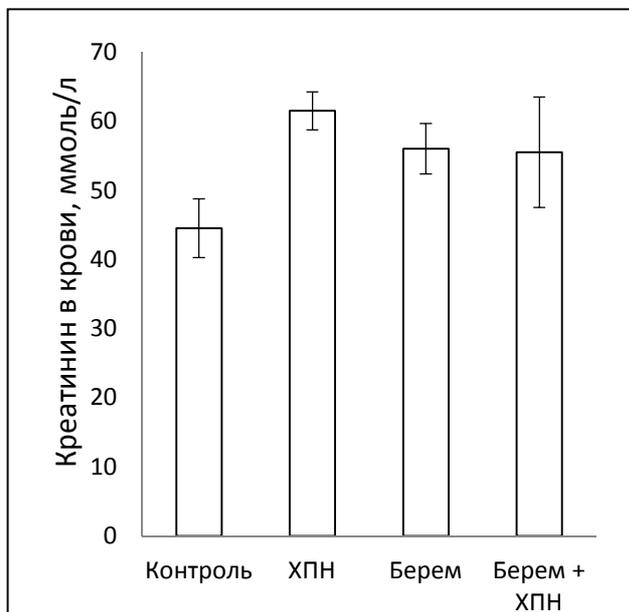


проанализированных параметров, можно заключить, что при ХБП-подобном

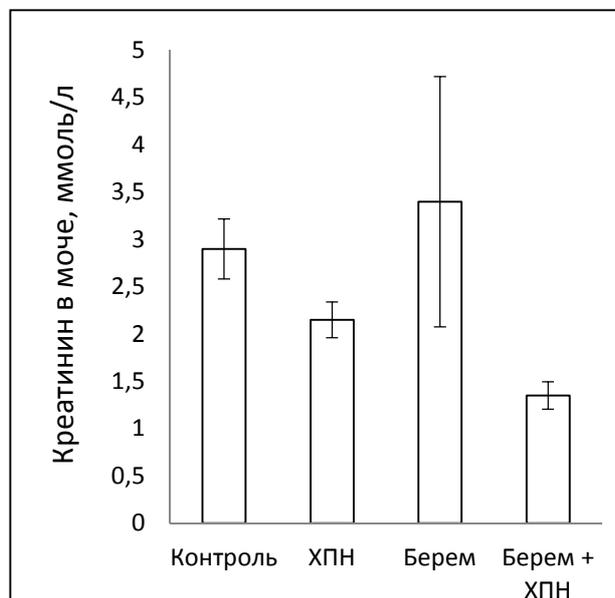


состоянии незначительно падает концентрация креатинина в моче, а концентрация креатинина и мочевины в крови растет. Полиурия и повышение суточного выделения белка, по-видимому, характеризуют нарушение гломерулярного фильтра и ухудшения реабсорбции воды в нефроне, что указывает на начало развития ХБП, на данном этапе скомпенсированной, поскольку значимого повышения концентрации креатина и мочевины в крови не наблюдается.

Беременность на фоне ХБП, как показано, не вызвала значимых изменений всех исследованных параметров, из чего можно заключить, что на уже поврежденную почку, в которой завершились как повреждающие, так и регенеративные процессы, значимого влияния беременность не оказывает.



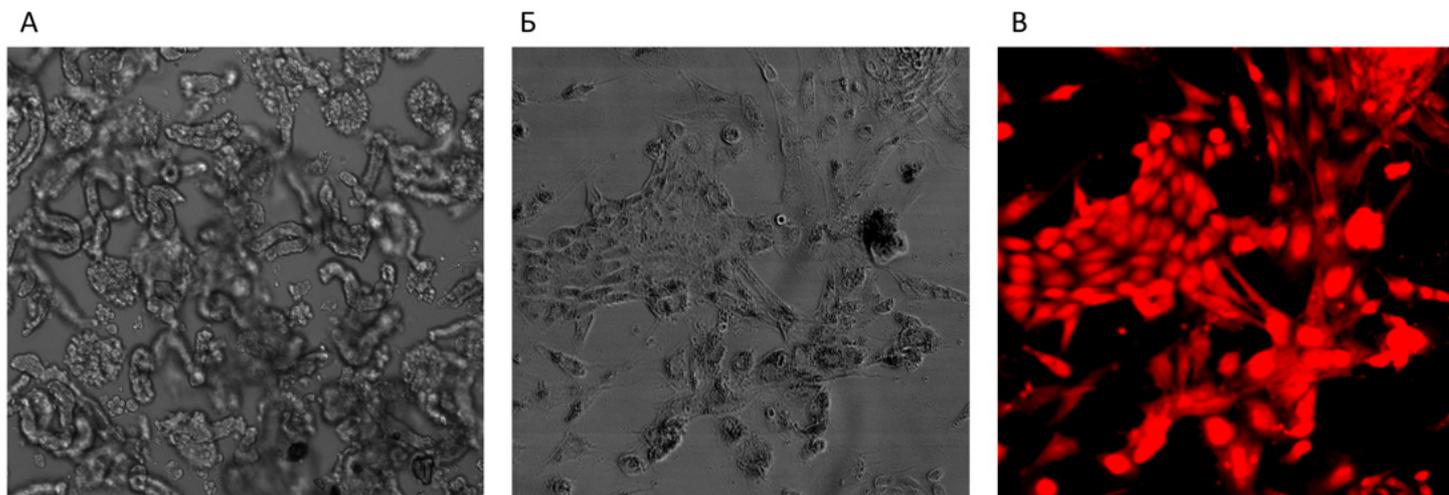
**Рисунок 14.** Уровень креатинина в крови крыс через 2 месяца после И/Р почки небеременных (ХБП, n=3) и беременных (Беремен +ХБП, n=3) крыс, а также у интактных небеременных (Контроль, n=3) и беременных (Беремен, n=3) животных.



**Рисунок 15.** Уровень креатинина в моче крыс с хронической почечной недостаточностью у небеременных (ХБП, n=3) и беременных (Беремен +ХБП, n=3) крыс, а также у интактных небеременных (Контроль, n=3) и беременных (Беремен, n=3) животных.

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

Моделирование повреждения на клеточном уровне проводилось на первичной культуре эпителия почечных канальцев небеременных, беременных и псевдобеременных животных. Для доказательства фенотипа клеток, первичная культура была окрашена антителами к специфическому белку Тамма-Хорсфала, характерного для эпителия почечных канальцев, что подтвердило чистоту получаемых канальцевых клеток (Рис.16). Было доказано, что выделяемая культура клеток действительно является культурой эпителия почечных канальцев. В качестве модели повреждения

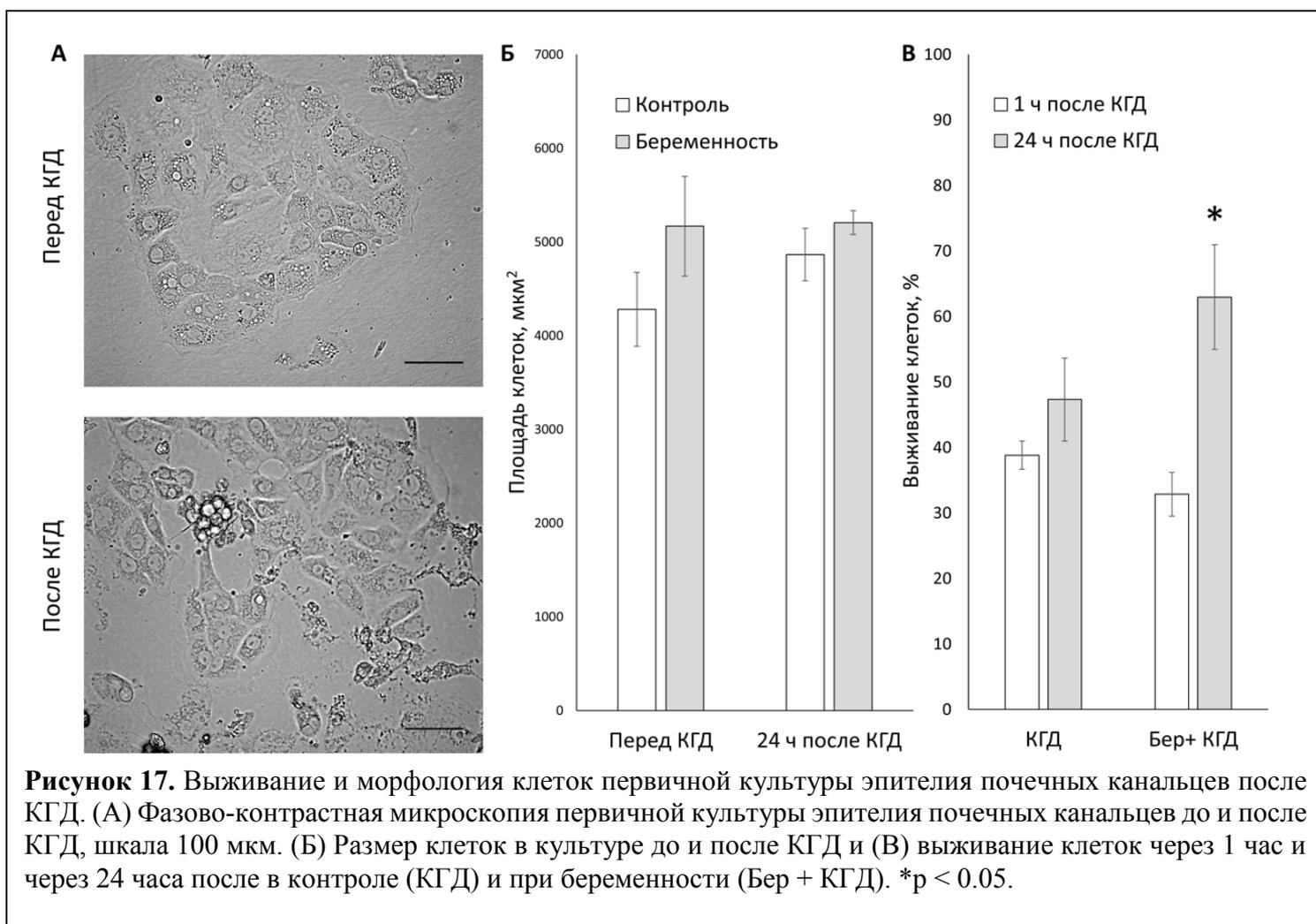


**Рисунок 16.** Фенотипирование первичной культуры эпителия почечных канальцев (А) Микроскопическое изображение почечных канальцев в процессе выделения; (В) Фазово-контрастная микроскопия клеток эпителия почечных канальцев через 2 дня после *in vitro* культивации; (С) Флуоресцентная микроскопия тех же клеток, помеченных антителами к специфическому белку эпителия почечных канальцев Тамм-Хорсфаллу.

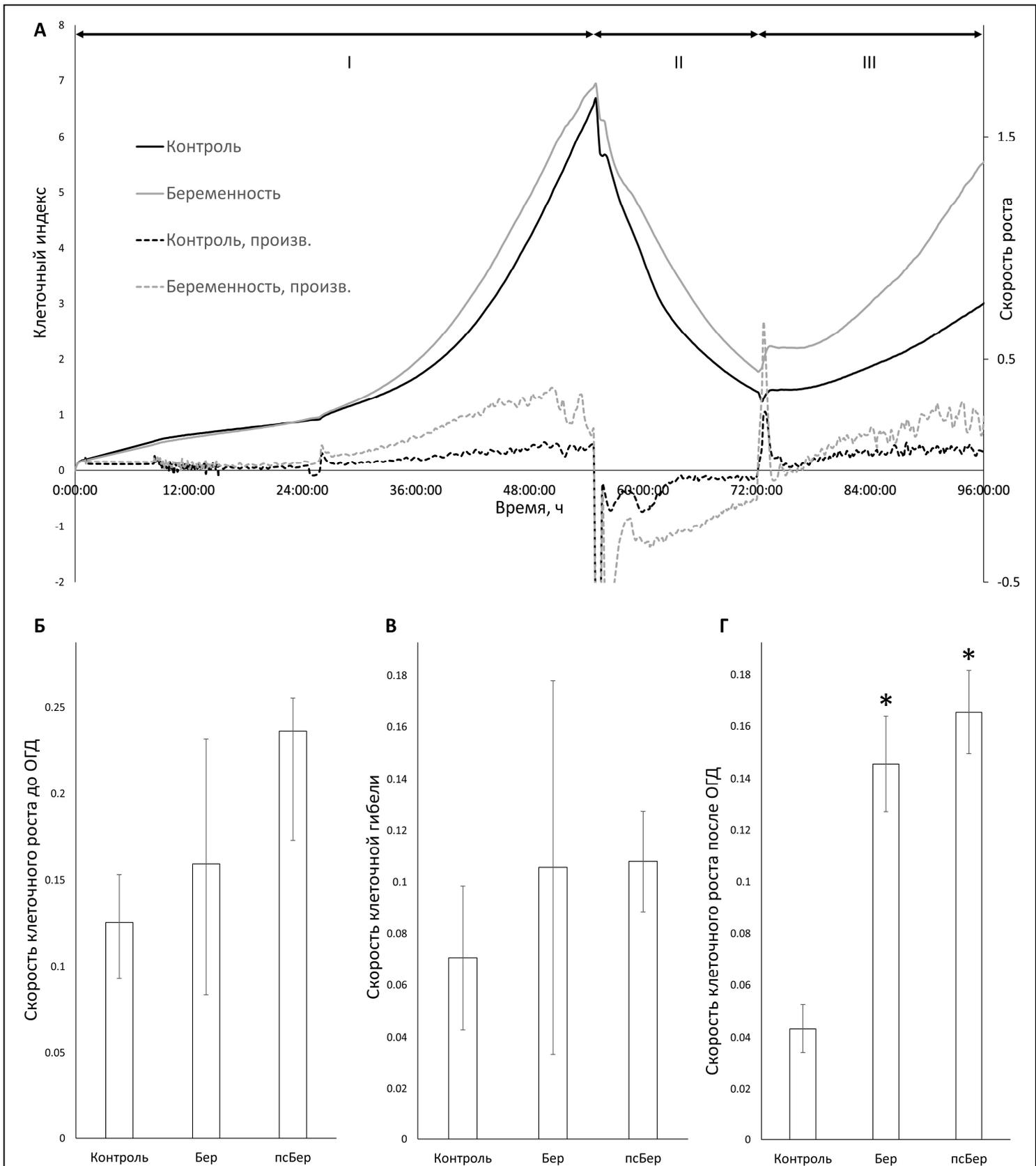
использовалась кислородно-глюкозная депривация (КГД) – широко применяемая клеточная модель ишемического повреждения.

Для оценки гибели почечных клеток мы использовали стандартный МТТ тест, позволяющий оценить жизнеспособность культуры клеток. Было обнаружено (Рис.17, В), что КГД вызывала значительную гибель клеток почечного эпителия, однако, через 1 час после КГД значимого различия в выживаемости между культурами клеток, выделенными из почек беременных и небеременных животных, не обнаруживается. Жизнеспособность клеток почки в обеих группах составляла примерно 35% относительно жизнеспособности 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. КГД также значимо не повлияла на площадь, занимаемую клетками (Рис.17, Б).



Для прямого исследования вклада пролиферации в наблюдаемое повышение толерантности клеток почки к ишемии был проведен мониторинг роста клеточной культуры в реальном времени. С его помощью были получены кривые роста и гибели клеточных культур на протяжении нескольких суток: от момента выделения клеток из органа до 24 часов после окончания КГД. Для числовой оценки скорости роста и гибели культуры была вычислена производная клеточного индекса, регистрируемого прибором. Мы не обнаружили различий в скорости роста в период до КГД между клетками канальцев, выделенных из небеременных, беременных и псевдобеременных животных. Это можно видеть по сходному углу наклона кривых клеточного индекса в I фазу (Рис.18, А), а также по отсутствию значимых различий в среднем значении скорости роста клеток на этом отрезке (Рис.18, Б).



**Рисунок 18.** Гибель и пролиферация первичной культуры клеток эпителия почечных канальцев, оцененная в режиме реального времени до и после кислородно-глюкозной депривации (КГД). (А) Пролиферация и скорость роста клеток, полученных из 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 после КГД клеток (фаза III), полученных из небеременных (Контроль, n=8), беременных (Бер, n=8) и псевдобеременных (псБер, n=3) животных. \*p < 0.05 по сравнению с контролем.

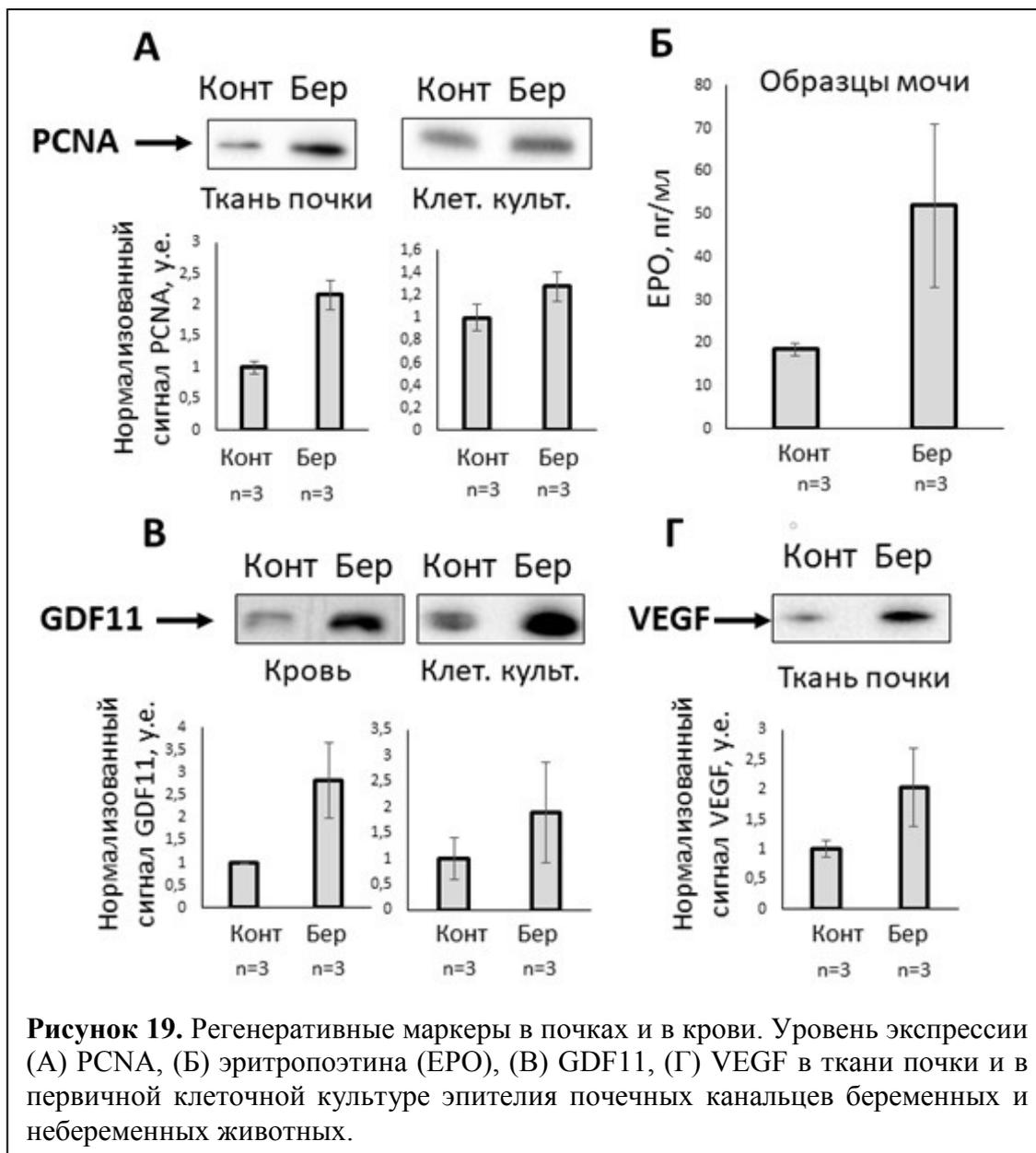
Также не было обнаружено различий в скорости гибели клеток во время КГД, что можно видеть по одинаковому углу наклона кривых клеточного индекса в II фазу (Рис.18, А), а также по отсутствию значимых различий в среднем значении скорости гибели клеток на этом отрезке (Рис.18, В). Во время второй фазы роста после КГД в культурах, полученных от беременных и псевдобеременных крыс, наблюдалась более высокая скорость пролиферации клеток, в среднем в 3,5 раза превышающая скорость роста клеток, полученных от небеременных животных (Рис.18, А, Г). Это говорит о потенциально гораздо большей возможности к пролиферации клеток почек беременных после ишемического повреждения. Эти данные согласуются с описанными выше результатами жизнеспособности клеток в МТТ тесте.

## **6. 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.19). Уровень одного из классических маркеров пролиферации клеток PCNA был почти вдвое выше в образцах тканей почек беременных крыс (Рис.19, А). В первичной культуре эпителия почечных канальцев, полученных из почек беременных животных, также наблюдался более высокий уровень PCNA по сравнению с культурой, выделенной из почек интактных самок (Рис.19, А). Таким образом, можно говорить о том, что эпителий почки беременных крыс пролиферирует более активно, чем у контрольных самок.

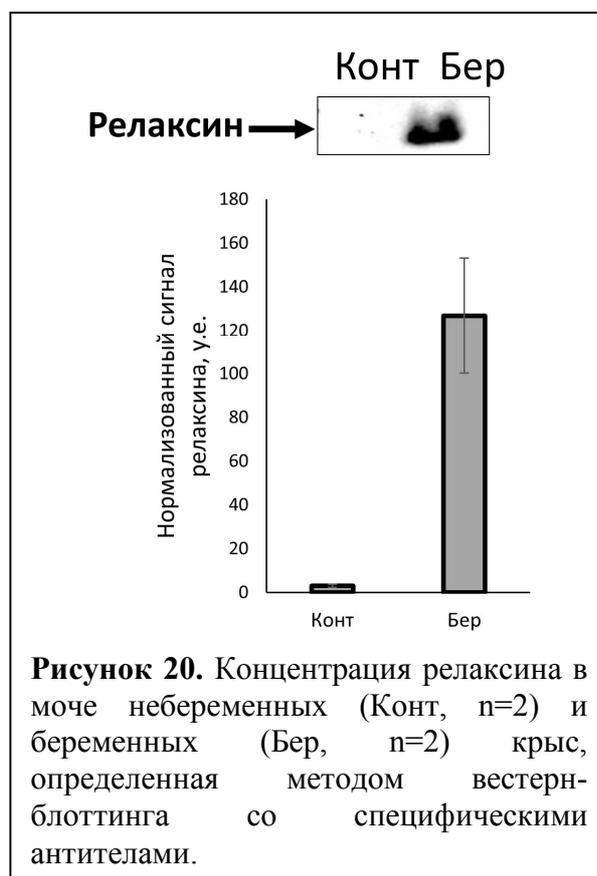
Аналогичная тенденция наблюдалась и с другими молекулами, ассоциируемыми с регенерацией после повреждений. Уровень маркера регенерации GDF11, рассматриваемого иногда как фактор омоложения ткани, был повышен в крови беременных крыс почти в три раза по сравнению с контрольными животными (Рис.19, В). В культуре клеток почечного эпителия,

выделенного из почек беременных самок и культивируемого *in vitro*, также наблюдалась повышенная продукция GDF11 (Рис.19, В).



Еще один потенциально антиишемический белок, фактор роста эндотелия сосудов VEGF был вдвое выше в ткани почки беременных крыс (Рис.19, Г). Кроме того, в моче беременных крыс был три раза повышен уровень эритропоэтина – гормона, обладающего помимо влияния на эритропоэз еще и общим цитопротекторным действием (Рис.19, Б). Поскольку основным местом продукции эритропоэтина у взрослых животных является почка, повышение его количества в моче однозначно указывает на высокий уровень его синтеза почками беременных крыс. Также в моче беременных самок заметно выше

концентрация релаксина (Рис.20), который в ряде работ также ассоциируют с повышенной устойчивостью к повреждениям [227]. В совокупности именно эти факторы могут обуславливать повышенный регенеративный потенциал почек беременных животных и обеспечивать их толерантность к ишемическому повреждению.

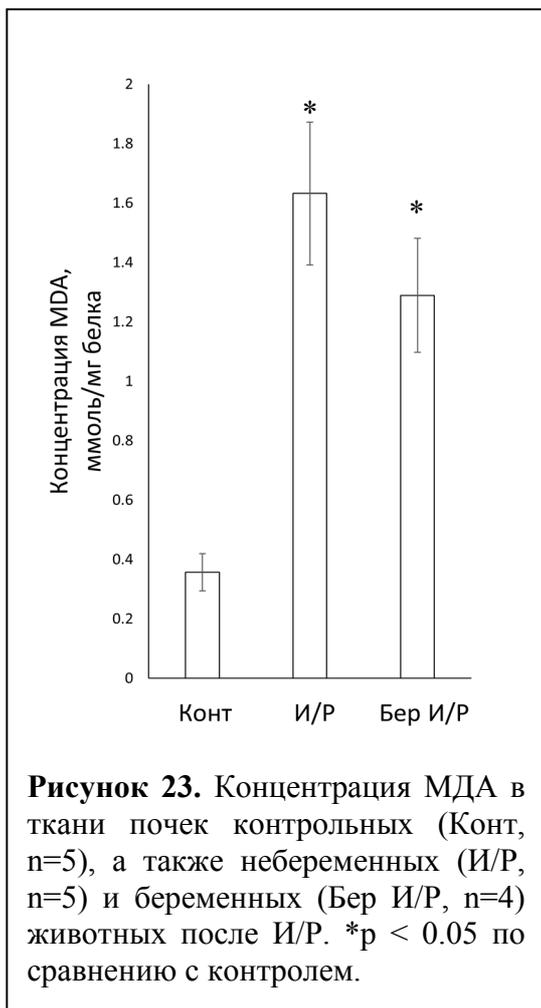
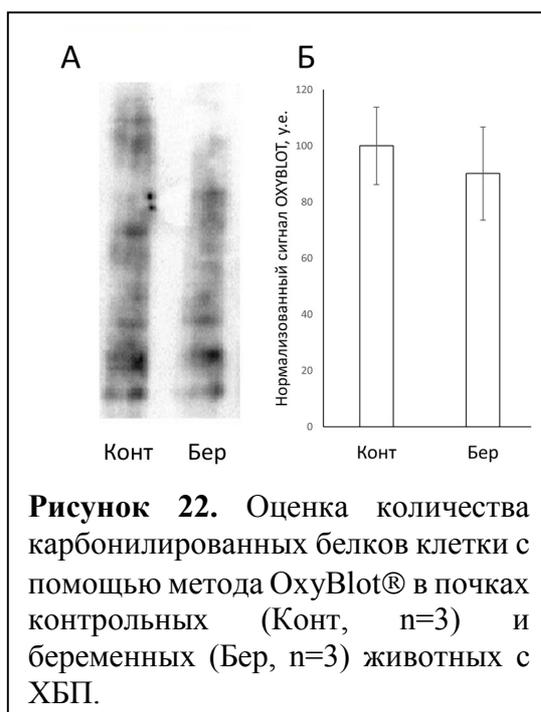
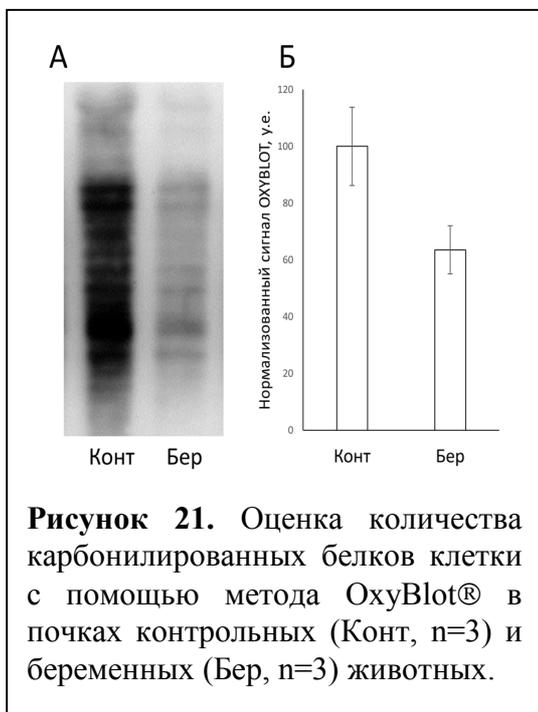


## 7. Влияние беременности на функционирование митохондрий и окислительный стресс при ишемии почки

С помощью метода Oxyblot мы оценили количество карбонилированных белков в ткани почки – продукта окислительной модификации белков (Рис.21 и 22). Этот параметр служит маркером уровня генерации АФК и окислительного стресса. Мы обнаружили, что в норме в ткани беременных животных уровень карбонилирования белков на 40% ниже, чем у небеременных животных (Рис.21). При этом уровень карбонилирования белков у беременных и небеременных животных, перенесших И/Р за 2 месяца до взятия образцов, значимо не отличался (Рис.22). Это согласуется с описанными выше данными по функционированию почек через 2 месяца после И/Р, показавших, что беременность на фоне уже имеющейся ХБП не оказывала заметного эффекта на почки.

В острый период после И/Р была проанализирована концентрация малонового диальдегида (МДА), продукта перекисного окисления липидов,

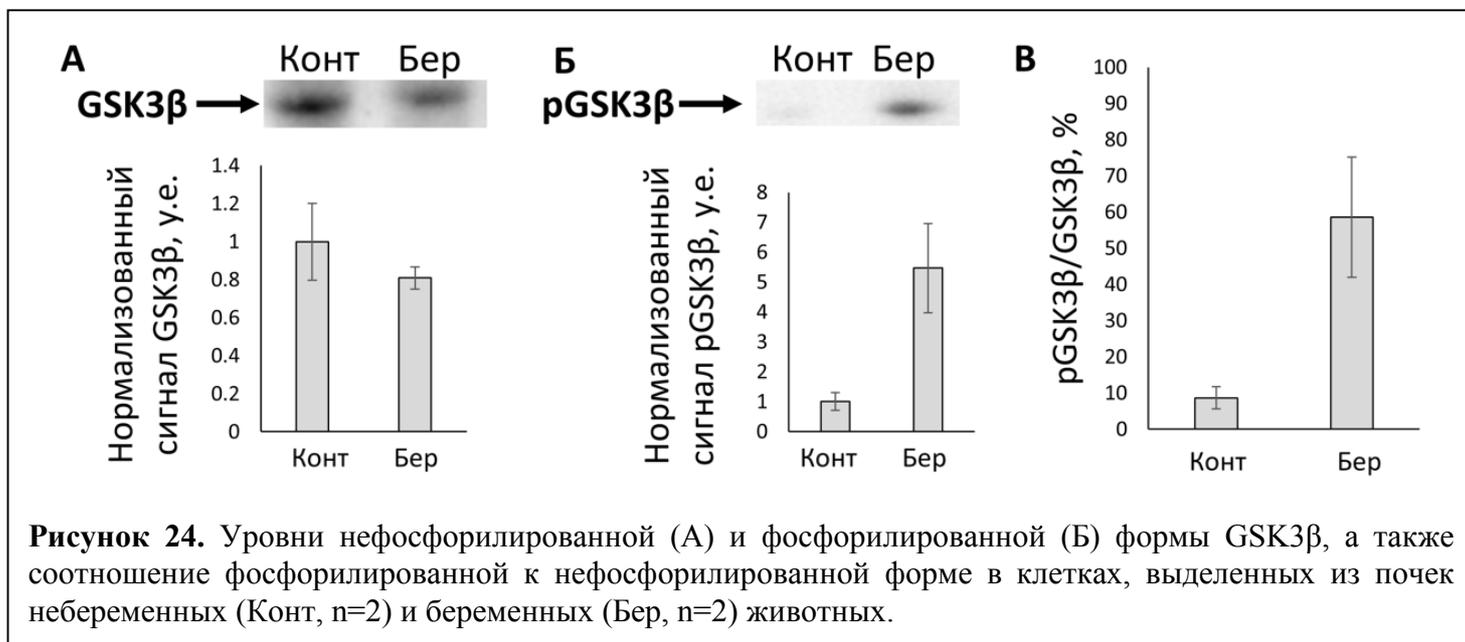
которая отражает уровень окислительного повреждения клеточных мембран во время пост-ишемического окислительного стресса (Рис.23). Было показано, что после И/Р количество МДА в ткани увеличивается в 4 раза, в то время как



при И/Р почки на фоне беременности концентрация МДА возрастает на 20% меньше. Это служит свидетельством того, что беременность снижает окислительный стресс индуцированный И/Р.

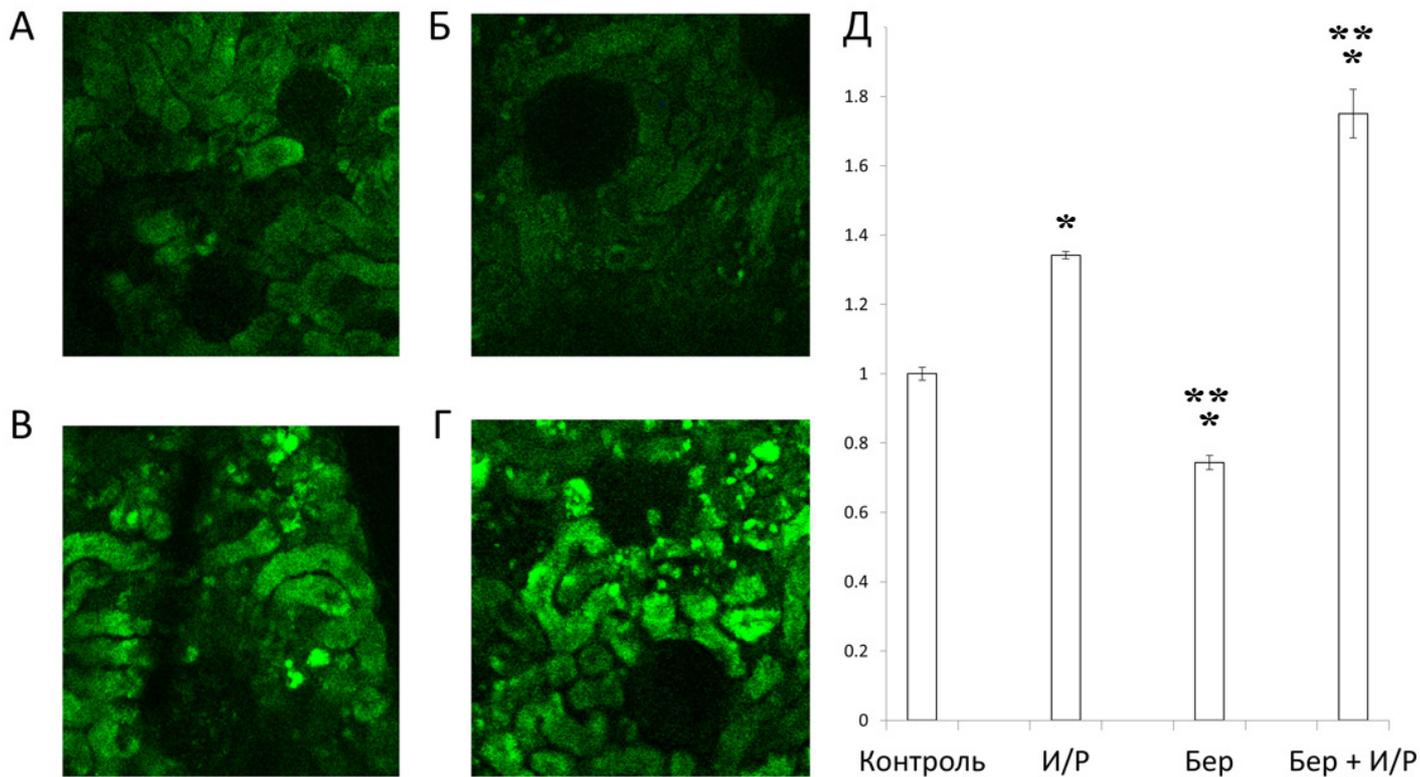
Также было обнаружено значительное изменение в статусе одного из ключевых белков, ассоциируемых с ишемической толерантностью, GSK3β (Рис.24). Ингибирующее фосфорилирование данного белка в целом ряде работ ассоциируют с лучшим прогнозом и защитой при ишемических патологиях [157,170,228]. Экспрессия данного

белка была снижена в клетках почек беременных животных (Рис.24, А), а его фосфорилирование напротив повышено (Рис.24, Б). Это в совокупности обеспечило увеличение соотношения pGSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  в 6-7 раз у беременных животных (Рис.24, В).

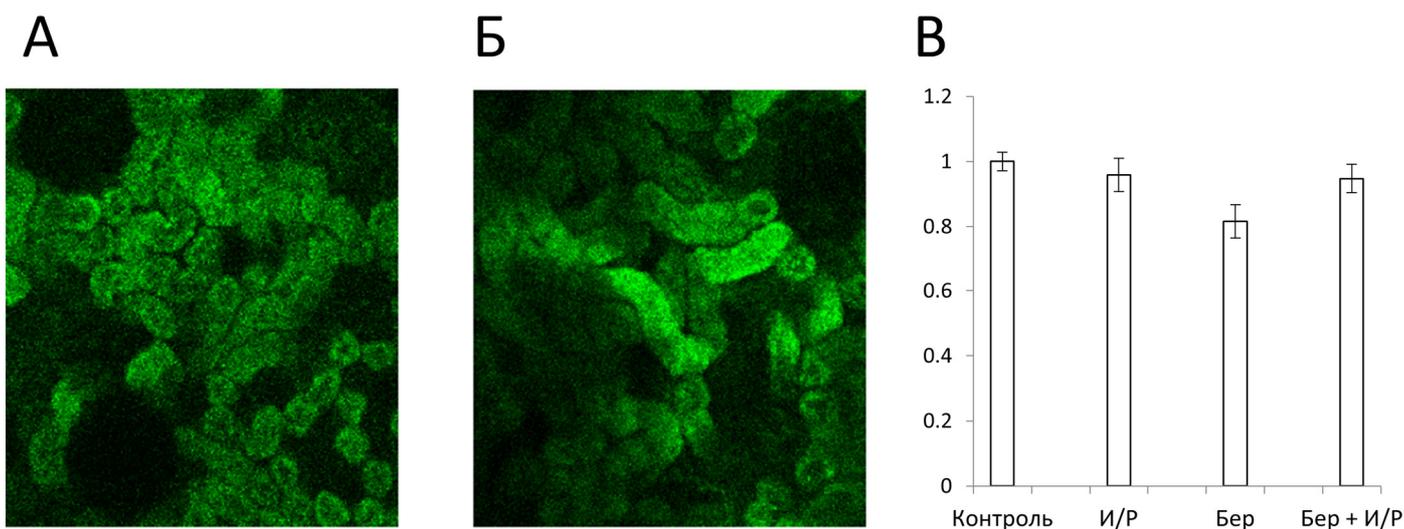


Для выяснения роли митохондрий и окислительного стресса в описываемых процессах, была проведена серия опытов на витальных срезах почки с использованием конфокальной микроскопии и флуоресцентных зондов.

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 животных на 25% (Рис.25, 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 интактной беременной самки (Рис.25, Б и Г), тогда как у небеременных животных И/Р приводит к усилению флуоресценции DCF на 40% (Рис.25, А и В). Это приводит к тому, что флуоресценция DCF в ткани беременного животного после И/Р превосходит значения небеременных животных после И/Р приблизительно на 30% (Рис.25, Д).



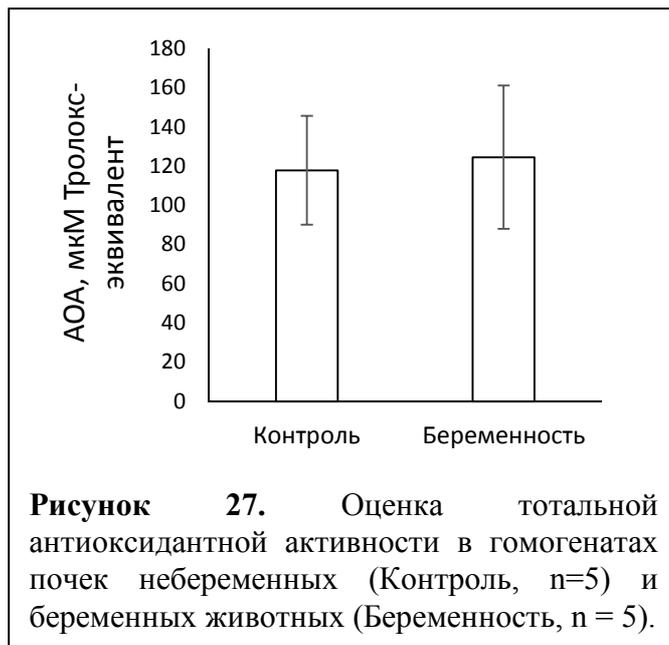
**Рисунок 25.** Оценка продукции АФК в ткани почки на витальных срезах. Конфокальная микроскопия витальных срезов ткани почки, окрашенных флуоресцентным зондом DCF интактных (А) небеременных (Контроль, n=7) и (Б) беременных (Бер, n=6), (В) небеременных (И/Р, n=7) и (Г) беременных (Бер + И/Р, n=6), подвергшихся 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.



**Рисунок 26.** Оценка продукции окиси азота в ткани почки на витальных срезах. Конфокальная микроскопия витальных срезов ткани почки, окрашенных флуоресцентным зондом DAF-2 (А, n=4) небеременных (И/Р) и (Б) беременных (Бер + И/Р, n=3), подвергшихся И/Р. (В) Среднее значение флуоресценции, подсчитанное по всем изображениям во всех группах.

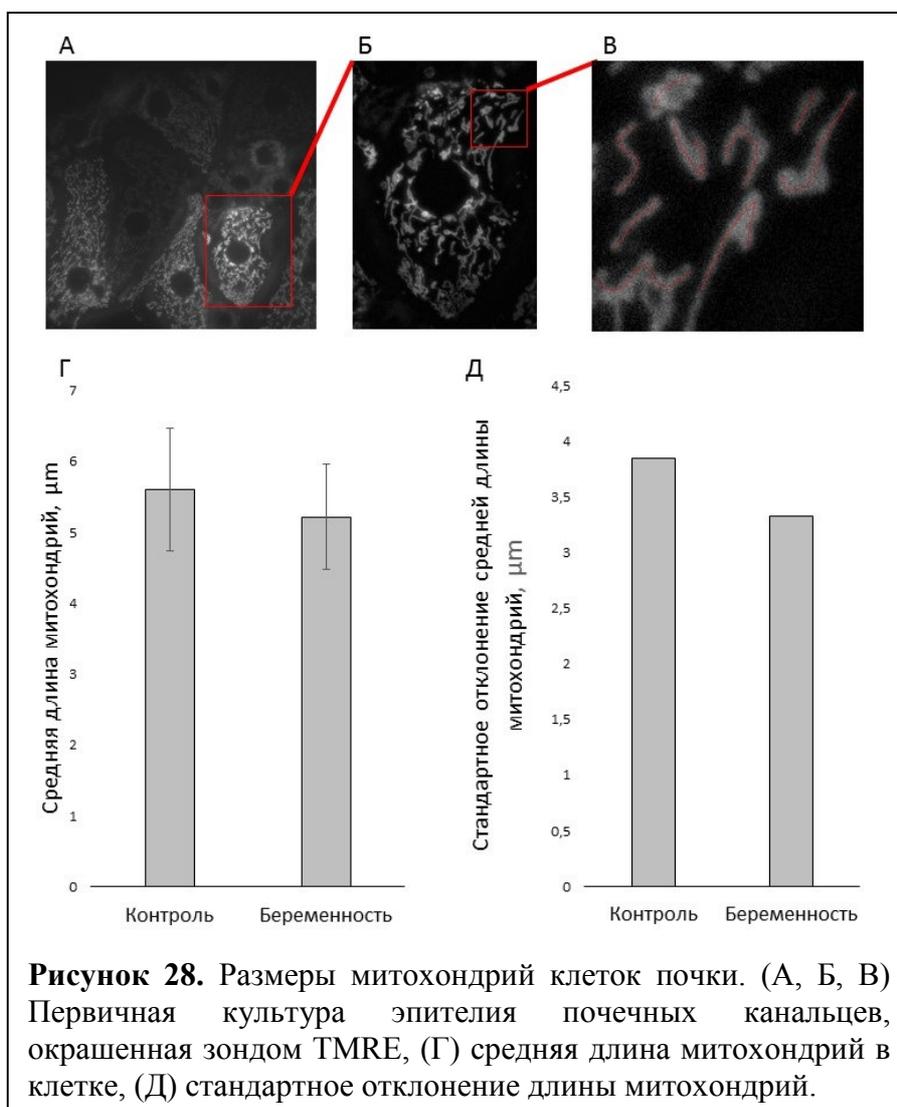
С помощью зонда DAF-2 была проанализирована продукция оксида азота в ткани почки (Рис.26), который также может участвовать в окислительном стрессе и нитрозильном повреждении компонентов клеток. Однако, значимых различий между группами обнаружено не было.

Для того, чтобы выяснить, обуславливаются ли наблюдаемые различия в концентрации АФК собственно генерацией АФК или различиями в антиоксидантных системах, в образцах ткани почек была измерена **тотальная антиоксидантная активность (АОА, Рис.27)**. Значимых различий обнаружено не было, что говорит о том, что наблюдаемые различия в генерации АФК, скорее всего, не обусловлены различиями в концентрации антиоксидантных молекул или ферментов в клетках.



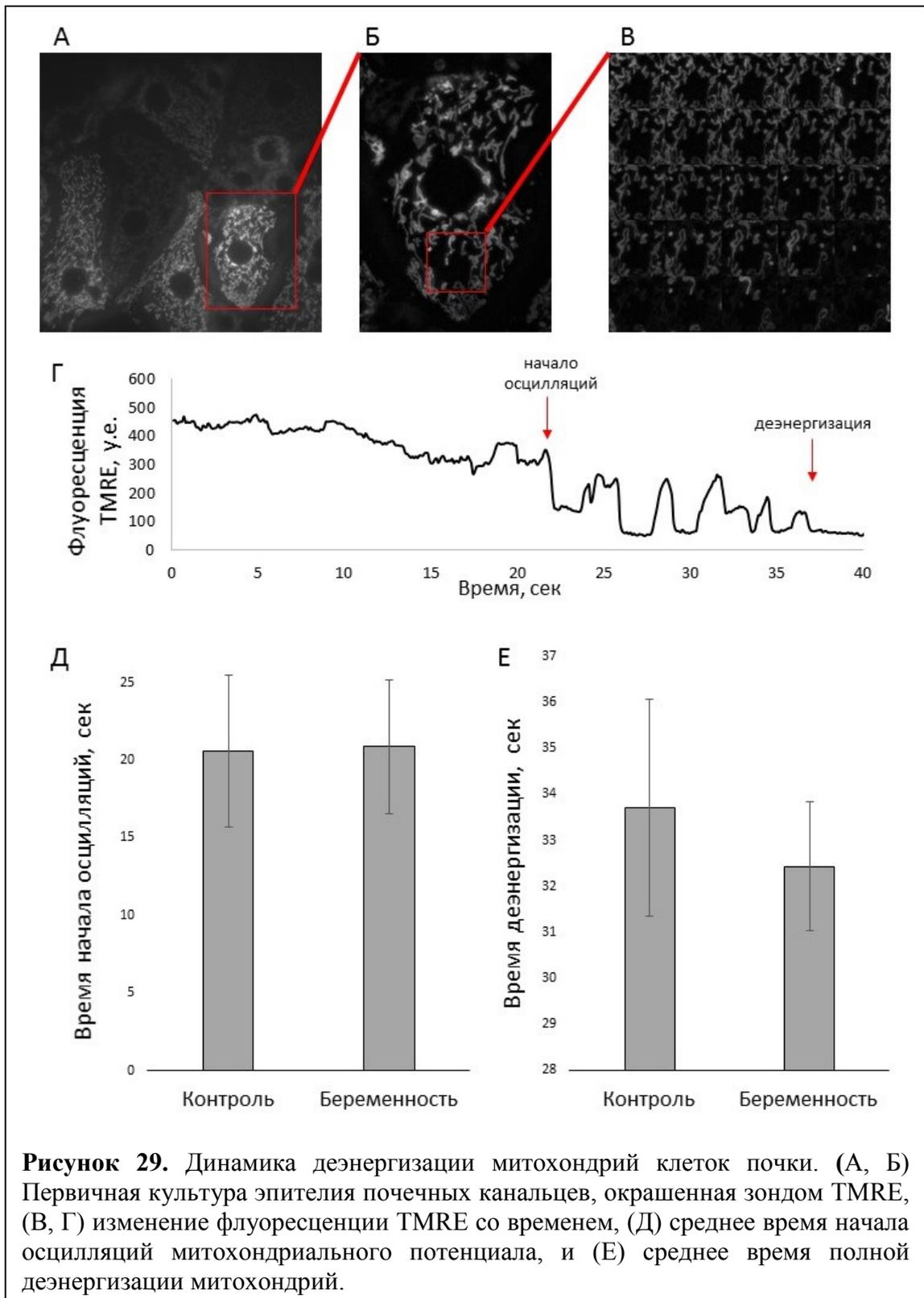
Митохондрии, играющие ключевую роль в окислительном стрессе и ишемическом повреждении клеток, были охарактеризованы в первичной культуре эпителия почечных канальцев. Проведенный анализ размеров митохондрий (Рис.28) отражает состояние митохондриальной популяции и работы системы дробления-слияния в целом. Значимых различий ни в средней длине митохондрий, ни в вариабельности этого признака в популяции между клетками, выделенными из контрольных и беременных животных, обнаружено не было.

Также была оценена устойчивость митохондрий к окислительному повреждению (Рис.29). Для этого оценивалось минимальное время облучения индивидуальных митохондрий, через которое они начинали демонстрировать осцилляции митохондриального потенциала (на видео выражающиеся в «мигании» митохондрий, окрашенных зондом на митохондриальный



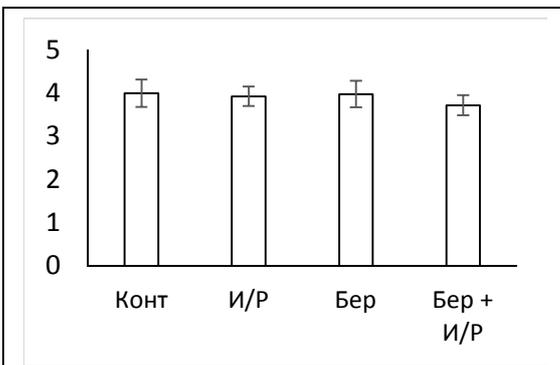
потенциал TMRE), а также время полной деэнергизации митохондрий. Данный параметр важен для оценки состояния митохондрий и их устойчивости к повреждению. Однако, значимых различий в устойчивости митохондрий, выделенных из контрольных и беременных животных, к фотодинамическому окислительному стрессу обнаружено не было.

Непосредственно функционирование митохондрий было проанализировано на митохондриях, выделенных из почек крыс. Дыхательный контроль (Рис.30), характеризующий работу дыхательной электрон-транспортной цепи и рассчитывающийся как отношение максимальной скорости разобщенного дыхания ( $V_3$ ) к скорости дыхания на сукцинате ( $V_4$ ), не отличался между группами как в контроле, так и сразу после И/Р. Это говорит о том, что изменения, вызываемые беременностью, не затрагивают электрон-транспортную цепь митохондрий.



**Рисунок 29.** Динамика деэнергизации митохондрий клеток почки. (А, Б) Первичная культура эпителия почечных канальцев, окрашенная зондом TMRE, (В, Г) изменение флуоресценции TMRE со временем, (Д) среднее время начала осцилляций митохондриального потенциала, и (Е) среднее время полной деэнергизации митохондрий.

С помощью зонда на АФК DCF (Рис.31) было показано, что митохондрии, выделенные из почек интактных животных, генерировали значительно больше АФК, чем из животных, подвергшихся И/Р: в течение часа эти различия нарастали (Рис.32, А) и достигали 3х-кратной разницы. Митохондрии, изолированные из почек беременных животных, занимали

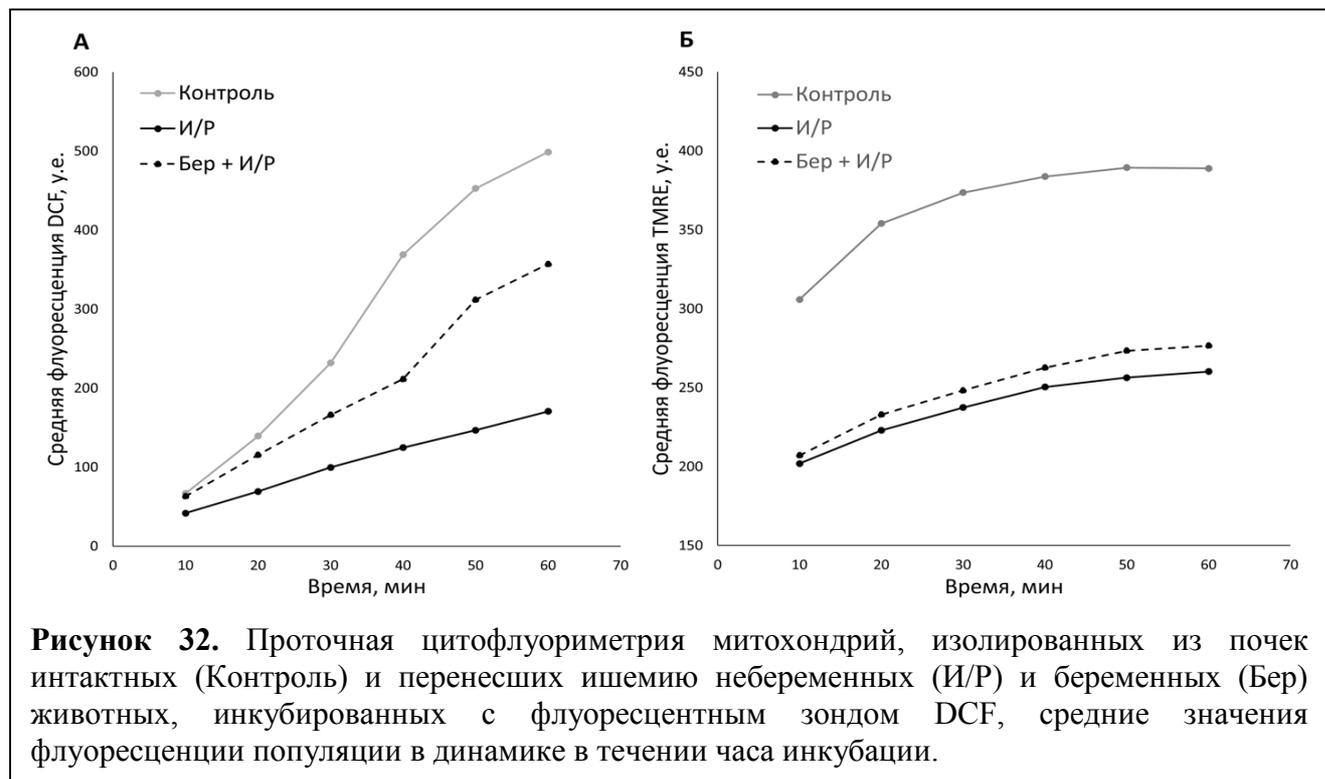
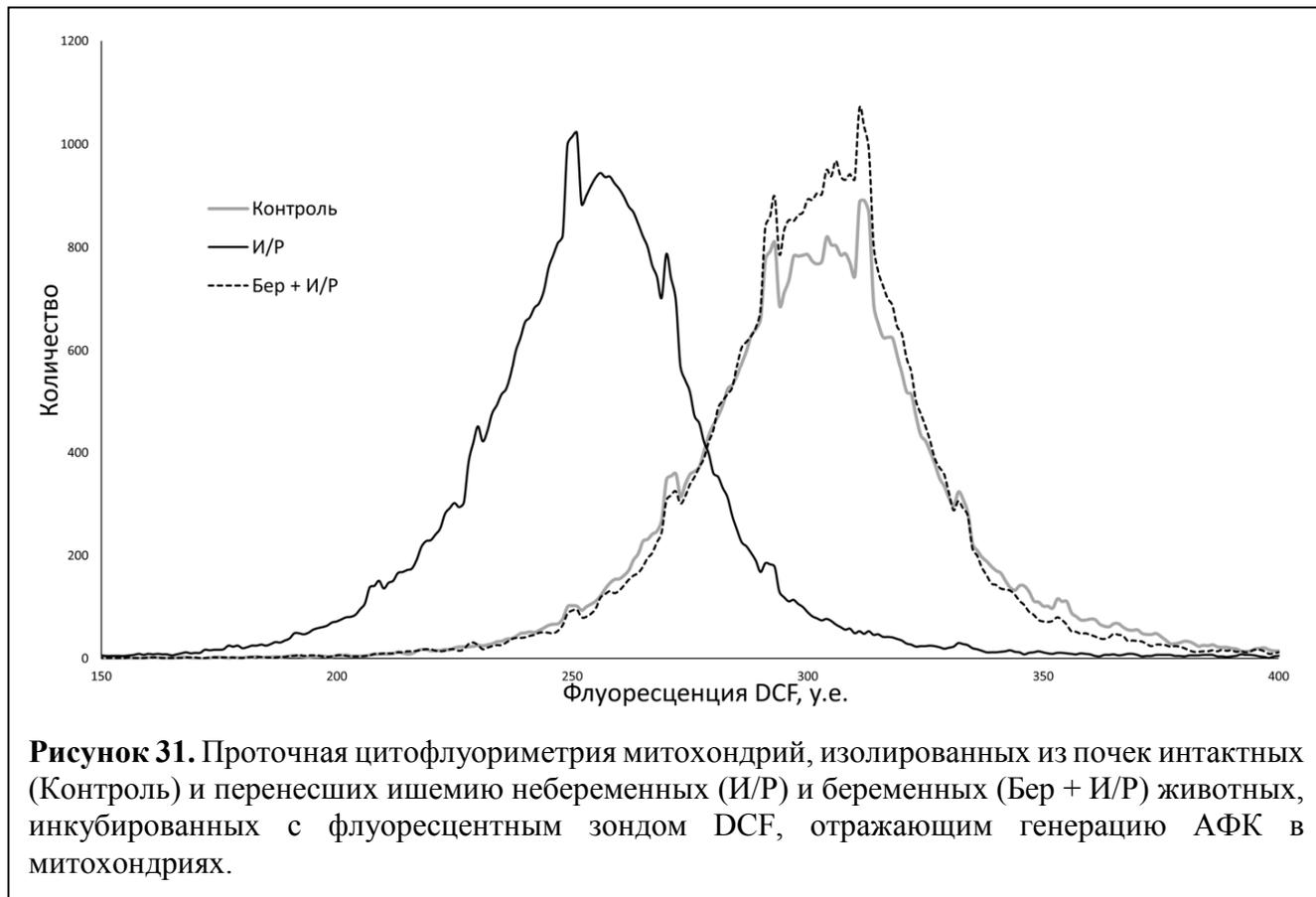


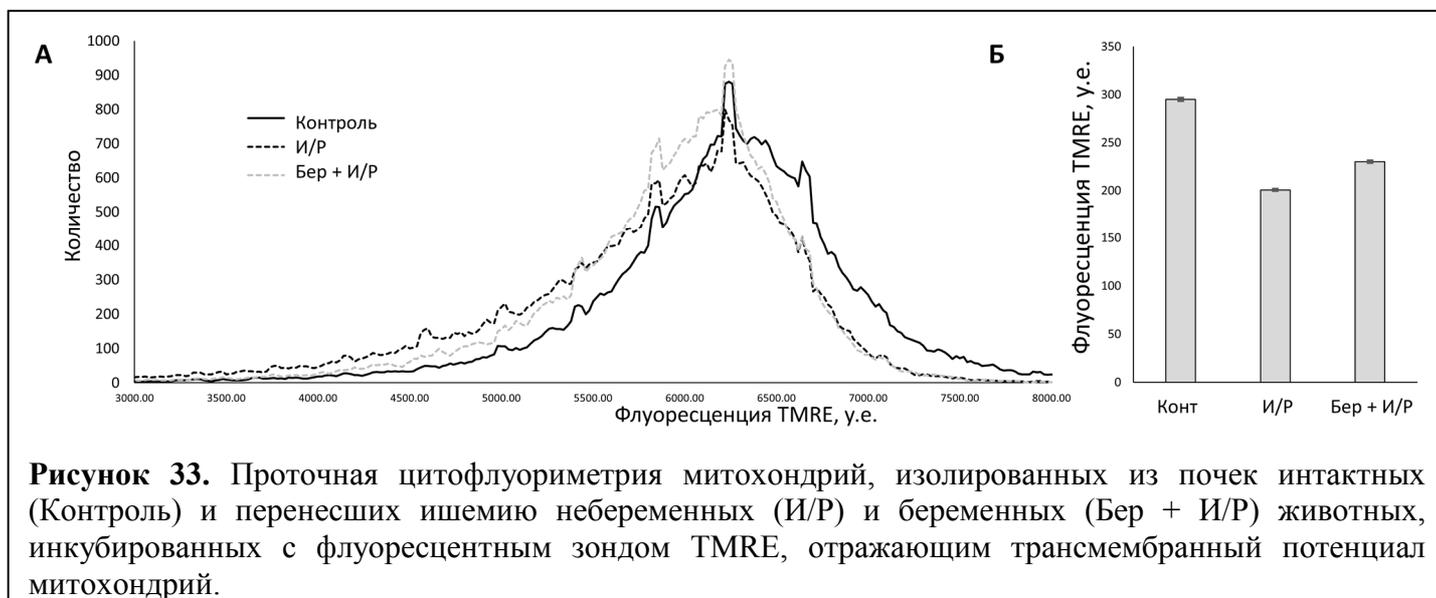
**Рисунок 30.** Дыхательный контроль митохондрий почек, выделенных из небеременных (Конт, n=6), беременных (Бер, n=6) и подвергшихся И/Р небеременных (И/Р, n=3) и беременных (Бер + И/Р, n=3) животных. Дыхательный контроль рассчитывался как отношения максимальной скорости разобщенного дыхания (V3) к скорости дыхания на сукцинате (V4).

промежуточное положение, генерируя в 2 раза больше АФК, чем органеллы из поврежденных почек небеременных, и в 1,5 раза меньше, чем из интактных животных. В случае с выделенными митохондриями это, по-видимому, является характеристикой интактности митохондрий, так как АФК являются побочным продуктом работы дыхательной цепи, а антиоксидантные клеточные системы в данном случае отсутствуют. Таким образом, количество АФК прямо пропорционально работе

дыхательной цепи и можно сделать вывод о том, что И/Р нарушает работу дыхательной цепи митохондрий, а в случае почек беременных крыс эти повреждения значительно уменьшены.

Изолированные митохондрии из почек контрольных животных также аккумулялировали больше флуоресцентного зонда TMRE, чем митохондрии из животных, подвергшихся И/Р (Рис.32, Б). Это указывает на меньший трансмембранный потенциал митохондрий почки после И/Р, то есть такие митохондрии функционируют менее эффективно, чем митохондрии интактных почек. Беременность незначительно обращала это изменение. Гистограмма распределения популяции по флуоресценции TMRE (Рис.33) отражает тот факт, что основное различие приходится на плечо распределения, относящееся к митохондриям с низким трансмембранным потенциалом. Таким образом, основное отличие митохондрий из почки беременных крыс от митохондрий из почек небеременных состоит в уменьшении количества низкопотенциальных деэнергизованных митохондрий после ишемии.



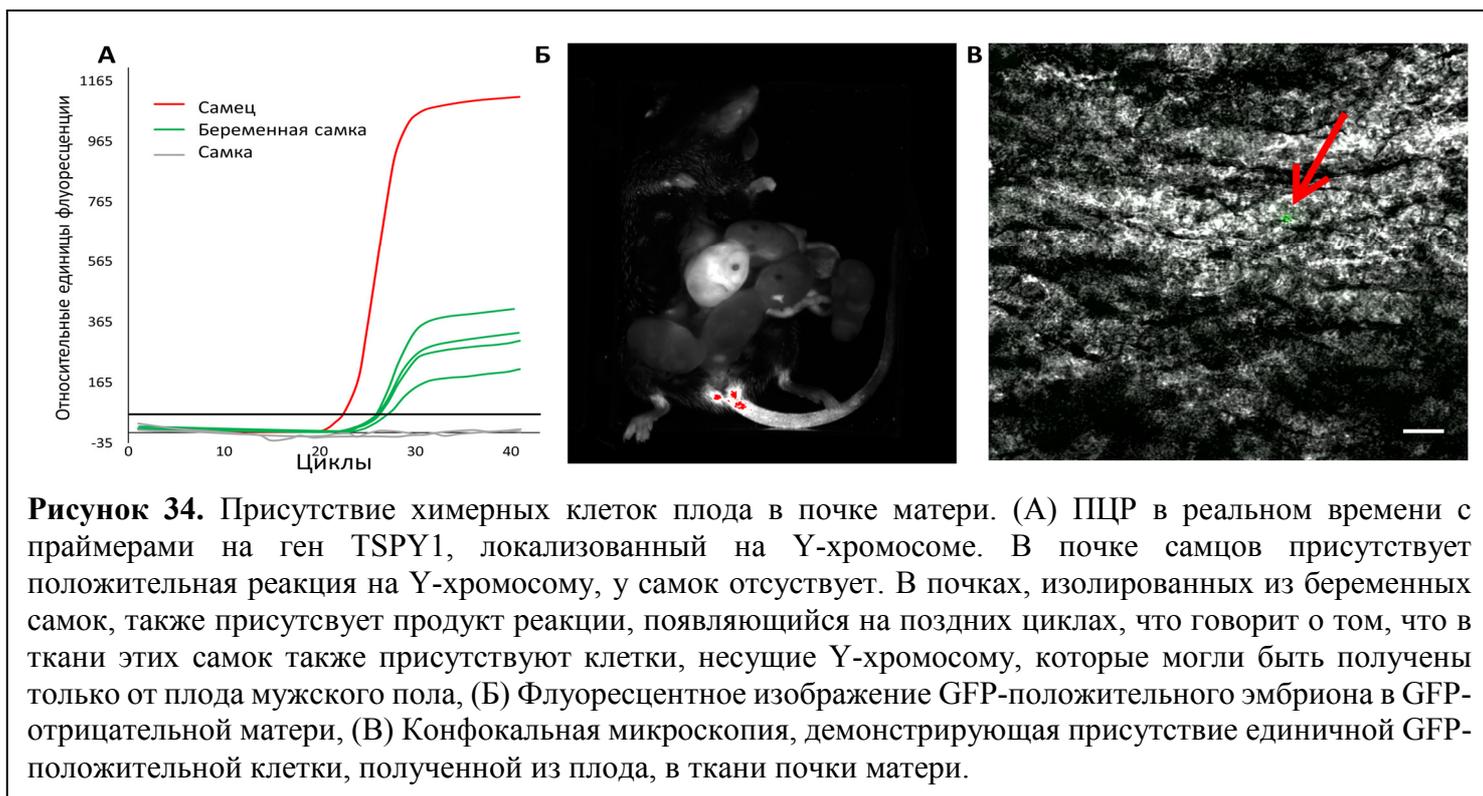


**Рисунок 33.** Проточная цитофлуориметрия митохондрий, изолированных из почек интактных (Контроль) и перенесших ишемию небеременных (И/Р) и беременных (Бер + И/Р) животных, инкубированных с флуоресцентным зондом TMRE, отражающим трансмембранный потенциал митохондрий.

## 8. Влияние плода на толерантность почки к ишемии

Помимо гормональных изменений в организме матери, можно предположить, что часть защитного эффекта беременности при ишемическом повреждении почки может обеспечиваться факторами, связанными с плодом. В частности, есть данные, подтверждающие возможность миграции стволовых клеток из тканей эмбриона в ткани матери [229]. Это явление называют микрохимеризмом. С целью проанализировать возможность микрохимеризма в почках у беременных, было протестировано наличие стволовых клеток плода в ткани почки беременной крысы. Данное явление 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.34, А). Также с помощью линии трансгенных мышей, несущих зеленый флуоресцентный белок GFP, было визуально проверено наличие клеток плода в почке матери: мышь дикого типа была скрещена с GFP-трансгенным самцом. Таким образом, часть эмбрионов матери имела клетки, обладающие зеленой флуоресценцией благодаря экспрессии белка GFP (Рис.34, Б). Затем с помощью проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии действительно были обнаружены единичные светящиеся клетки в ткани почки матери (Рис.34, В). Однако, никаких изменений в интенсивности миграции фетальных клеток в почку матери при ишемическом повреждении обнаружено не было. На фоне

ишемии не наблюдалось увеличения количества клеток плода, мигрировавших в почку матери. Принимая во внимание эти факты а также описанный выше выраженный защитный эффект гормональной псевдобеременности, 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.



## ОБСУЖДЕНИЕ

На настоящий момент, влияние беременности на нормальные и патологические процессы в организме с научной точки зрения описано не систематически, хотя и существует ряд работ, рассматривающих эффекты беременности на организм [230]. На данный момент основным источником знаний о воздействии беременности являются клинические наблюдения, которые указывают на то, что для некоторых патологий беременность является отягчающим фактором [231–233]. Однако следует учитывать, что масштабный скрининг функционирования органов редко проводится при нормально протекающей беременности. В данной работе была предпринята попытка заполнить пробел в знаниях о фундаментальных механизмах влияния беременности на патологические процессы в почках.

Чтобы оценить повреждение почек, были использованы классические клинические маркеры, служащие индикаторами дисфункции почек: в первую очередь, концентрация креатинина и мочевины в плазме крови. Оба вещества являются конечными продуктами азотистого обмена, подлежащего выведению почками. Повышение их концентрации в крови является признаком нарушения секреторных функций почки. Также в работе был использован новый биомаркер острого почечного повреждения NGAL [234], который не так давно был введен в клиническую практику и ассоциируется с острым повреждением почек на ранних сроках. Так, концентрация NGAL повышается даже в том случае, когда нарушения почечных функций, например, выведения креатинина и мочевины, еще не выявляются. Например, при потере менее 50% функциональных нефронов или при компенсации дисфункции поврежденной почки здоровой, концентрация креатинина в крови может подниматься не значительно, тогда как уровень NGAL в моче при этом драматически возрастает. Еще один маркер, отражающий повреждение почек, который мы использовали, – уровень МДА – конечного продукта перекисного

окисления липидов [235]. Его повышение в ткани говорит о том, что в липиды клеточных мембран были повреждены АФК во время окислительного стресса.

Уровень всех этих маркеров был ожидаемо повышен после моделирования И/Р почки. При этом беременность и псевдобеременность значительно защищали почки: концентрации всех этих маркеров были существенно ниже в образцах беременных животных, перенесших И/Р, чем у небеременных животных после И/Р. Снижение концентрации креатинина и мочевины в группе беременных говорит о том, что функция почек была нарушена в меньшей степени. Пониженный уровень NGAL говорит о меньшем структурном повреждении, а понижение концентрации МДА – о меньшем уровне окисления липидов в клетках ткани почки. Таким образом, по всем исследованным показателям можно заключить, что беременность защитила почки от острого ишемического повреждения и обеспечила значительное сохранение их функции.

Чтобы оценить морфологические повреждения почки, вызванные И/Р, были использованы методы классической гистологии, с помощью которых были проанализирована выраженность острого тубулярного некроза через 24 часа после ишемии [236]. В группе небеременных животных после И/Р в корковой зоне почки наблюдали выраженный канальцевый некроз, причем зоны некротизированных канальцев занимали большую часть ткани. В группе беременных животных, после И/Р некроз также присутствовал, но занимал значительно меньшую площадь. В основном, ткань почки была сохранна. Уменьшение числа дилатированных канальцев при И/Р на фоне беременности говорит о том, что обструкция нижних сегментов нефрона гиалиновыми цилиндрами и клеточным дебрисом также значительно менее выражена. Эти наблюдения являются прямым доказательством того, что морфо-функциональные изменения, провоцируемые ишемией в почечной ткани, нивелируются или снижаются при возникновении И/Р у беременных крыс.

Большой интерес представляет восстановление почки после ишемического повреждения в долгосрочной перспективе. Одним из главных

факторов, препятствующих полноценной регенерации, является фиброз [212]. В данной работе, было оценено образование фиброза в тканях животных через 2 месяца после И/Р. Было обнаружено, что в группе животных, которые были беременны на момент повреждения, через 2 месяца в ткани почки фиброз был выражен гораздо слабее. У этого факта может быть несколько объяснений: 1) первичное ишемическое повреждение было слабее, 2) вторичное повреждение в результате развития воспаления после И/Р было слабее, 3) образование фиброзной ткани во время беременности снижено, 4) у почечной ткани беременных животных выше потенциал к регенерации. В частности, вклад в уменьшение степени фиброза может вносить обнаруженное нами увеличение экспрессии фактора роста сосудов VEGF при беременности. Усиление роста сосудов улучшает снабжение ткани кислородом, что, по крайней мере отчасти, препятствует фиброзообразованию [237].

Чтобы детально проанализировать механизмы, обеспечивающие такую заметную защиту почек от повреждения при беременности, были использованы клеточные модели первичной культуры эпителия почечных канальцев взрослых животных. Важно отметить, что культура, полученная от взрослых животных, крайне редко используется из-за сложностей при культивировании. Однако, для целей данного исследования, повсеместно используемая культура из эмбриональных или неонатальных почек не подходила, поскольку эмбриональные клетки могут потенциально обладать той же устойчивостью к ишемии, что и клетки из беременного организма. Это может определяться либо факторами, продуцируемыми непосредственно эмбриональными тканями, либо за счет обмена через кровотоки факторами, продуцируемыми организмом матери при беременности. Для анализа гибели клеток почки при ишемии в рамках данной работы была использована модель ишемического повреждения *in vitro* – кислородно-глюкозная депривация на культуре почечных канальцев. С использованием системы мониторинга клеточной пролиферации в реальном времени значимых различий в пролиферации клеток почки, полученных из небеременных и беременных (или

псевдобеременных) животных до или во время КГД обнаружено не было. Однако, после окончания КГД клетки, полученные из беременных (и псевдобеременных) животных, демонстрировали значительно более высокую скорость пролиферации. Схожие результаты были получены и при использовании стандартного МТТ-теста [238], оценивающего жизнеспособность клеток по активности дегидрогеназ: сразу после КГД клеточные культуры беременных и небеременных не отличались по выживанию. Однако через 24 часа после КГД культура, полученная из беременных животных, демонстрировала заметно более высокие показатели жизнеспособности.

Из этих данных можно сделать вывод, что, возможно, клетки почек беременных крыс не более защищены от гибели, чем клетки небеременных, но быстрее восстанавливаются после повреждения, и ткань почек в целом более склонна к пролиферации и регенерации. Последнее подтверждается не только данными по пролиферации в реальном времени, но также и более высоким уровнем экспрессии маркера пролиферации PCNA в почках беременных животных. Также мы обнаружили, что в крови у беременных повышена экспрессия белка GDF11 – недавно открытого маркера регенерации и «омоложения», который изучается в моделях парабиоза [7,8]. В подобных работах в разных условиях показано, что при хирургическом объединении кровотока старого и молодого животного, часть патологических проявлений у старого животного обращается, и, в том числе, усиливается регенерация. Белок GDF11 считается одним из факторов, вызывающих подобное изменение. Беременность можно рассматривать как своеобразную форму парабиоза: крайне молодой организм (плод) частично соединен кровотоком (в той мере, в какой это позволяет проницаемость плацентарного барьера) с более взрослой особью (матерью). В этом контексте, повышение концентрации белка GDF11 в крови беременных самок представляется крайне интересной находкой.

Кроме двух вышеназванных факторов мы обнаружили при беременности повышение концентрации еще двух факторов, прочно ассоциируемых с регенерацией и восстановлением после повреждений: эндотелиального фактора роста сосудов VEGF [239] и эритропоэтина [240]. Оба фактора были повышены при беременности, и оба связывают с регенерацией после повреждения. Более того, в ряде работ падение экспрессии VEGF связывают с усилением фиброобразования. Логично предположить, что усиление роста сосудов, которое должен обеспечивать VEGF, будет препятствовать появлению областей почки, находящихся в частичной гипоксии из-за гибели сосудов во время ишемии/реперфузии, и, соответственно, препятствовать фиброзу ткани. Таким образом, эти данные указывают на то, что при беременности значительно активизированы процессы регенерации и пролиферации, что, вероятно, и обуславливает большую защищенность от повреждающих воздействий и более благоприятные долгосрочные последствия.

Что касается предполагаемой роли митохондрий и окислительного стресса в наблюдаемых явлениях, то был обнаружен ряд отличий между беременными и небеременными группами. Например, в ткани интактных беременных животных заметно снижена продукция АФК. Хотя после повреждения, продукция АФК в тканях беременных животных была выше, чем у небеременных животных. С другой стороны, при анализе функций изолированных митохондрий, значительных различий между почками беременных и небеременных крыс не было обнаружено. Также не было заметных изменений и в тотальной антиоксидантной активности в ткани почки. Полученные на данный момент результаты не позволяют говорить о значительном вкладе функций митохондрий в наблюдаемое явление. На текущий момент, логично предположить, что наблюдаемые отличия митохондриальных функций являются скорее следствием, чем причиной описываемых феноменов.

Как уже указывалось, наблюдаемое повышение толерантности почки к ишемическому ОПП может быть связано с факторами, ассоциированными с эмбрионом. В связи с этим, был проанализирован вклад микрохимеризма в почечной ткани – явления, при котором клетки плода попадают в кровоток матери и затем приживаются в различных органах [241]. Мы действительно обнаружили непрямым (с помощью ПЦР реального времени на наличие генов, сцепленных с Y-хромосомой) и прямым (с помощью конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии) методами наличие химерных клеток плода в ткани почек матери. Однако выраженного изменения этих параметров после ишемического повреждения почек показано не было. То есть, И/Р не усиливала миграцию эмбриональных клеток в почке матери. Кроме того, эксперименты с гормональной псевдобеременностью, при которой отсутствует плод, показали повышение устойчивости почек к И/Р, схожее с таковым при настоящей беременности. Это говорит о том, что, по-видимому, влияние плода на ишемическую толерантность почки минимально, и большая часть изменений объясняется скорее гормональными изменениями в организме матери.

Этот вывод согласуется с работами других исследователей, которые пришли к сходному заключению при исследовании регенерации печени и мышц при беременности [4,5]. Правда, в нашем случае регенерация почки шла по пути гиперплазии, а не гипертрофии: заметного изменения размера клеток после повреждения обнаружено не было, тогда как в работах других авторов описана усиленная гипертрофия клеток печени и мышц. Однако, это не кажется удивительным с учетом того, что у ткани печени и мышц гораздо выше возможность к динамическому изменению клеточности, чем у ткани почек.

В заключение стоит упомянуть данные клинических наблюдений, при которых беременность считается скорее отягчающим фактором при развитии патологий почек. Как указывалось ранее, в клинической практике

принципиально важным является конечный исход заболевания. Различные осложнения, такие как септический аборт, послеродовые сепсис, микроангиопатия, эндотелиальные дисфункции и преэклампсия, могут оказывать на конечный исход не меньшее влияние, чем первичное повреждение почек. Однако результаты данной работы говорят о том, что именно почки при беременности более устойчивы к ишемическому повреждению. Данные результаты важны не только для фундаментальной физиологической науки, но и для клинической практики: возможно, они позволят скорректировать лечение беременных при почечных патологиях, сместив фокус внимания с собственно повреждения почек на сопутствующие осложнения.

## **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 2 месяца после ишемии/реперфузии почки;
3. Защитный эффект обуславливается усилением пролиферативных и регенеративных свойств клеток почки во время беременности;
4. Беременность сопровождается повышением в почке факторов GDF11, релаксина, эритропоэтина, VEGF, PCNA и фосфорилированной формы GSK-3 $\beta$ ;
5. Влияние беременности на ишемическую толерантность почки обусловлено, в первую очередь, гормональными изменениями в организме матери, поскольку псевдобеременность симулирует эффект беременности.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 4-HNE – 4-гидроксиноненаля
- TMRE – Тетраметилродамин этилового эфира
- АОА – Антиоксидантная активность
- АТФ – Аденозинтрифосфат
- АФК – Активные формы кислорода
- БСА – Бычий сывороточный альбумин
- И/Р – Ишемия/реперфузия
- КГД – Кислородно-глюкозная депривация
- МДА – Малоновый диальдегид
- МТТ – Метил-тиазолтетразолий
- ОПП – Острое почечное повреждение
- ОР – Отношение рисков
- ОТН – Острый тубулярный некроз
- СКФ – Скорость клубочковой фильтрации
- ФСБ – Фосфатно-солевой буфер
- ХБП – Хроническая болезнь почек
- ЭПР – Эндоплазматический ретикулум

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Devarajan P. Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis. // *Curr. Opin. Pediatr.* 2005. Vol. 17, № 2. P. 193–199.
2. Rewa O., Bagshaw S.M. Acute kidney injury—epidemiology, outcomes and economics // *Nat. Rev. Nephrol.* 2014. Vol. 10, № 4. P. 193–207.
3. Schrier R.W. et al. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy // *J. Clin. Invest.* 2004. Vol. 114, № 1. P. 5–14.
4. Gielchinsky Y. et al. Pregnancy restores the regenerative capacity of the aged liver via activation of an mTORC1-controlled hyperplasia/hypertrophy switch. // *Genes Dev.* 2010. Vol. 24, № 6. P. 543–548.
5. Falick Michaeli T. et al. The rejuvenating effect of pregnancy on muscle regeneration. // *Aging Cell.* 2015. Vol. 14, № 4. P. 698–700.
6. Gregg C. et al. White Matter Plasticity and Enhanced Remyelination in the Maternal CNS // *J. Neurosci. Society for Neuroscience*, 2007. Vol. 27, № 8. P. 1812–1823.
7. Sinha M. et al. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. // *Science.* 2014. Vol. 344, № 6184. P. 649–652.
8. Loffredo F.S. et al. Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. // *Cell.* 2013. Vol. 153, № 4. P. 828–839.
9. Freitas-Rodríguez S., Rodríguez F., Folgueras A.R. GDF11 administration does not extend lifespan in a mouse model of premature aging // *Oncotarget.* 2016.
10. Hinken A.C. et al. Lack of evidence for GDF11 as a rejuvenator of aged skeletal muscle satellite cells // *Aging Cell.* 2016.
11. Conboy I.H. et al. Notch-Mediated Restoration of Regenerative Potential to Aged Muscle // *Science* . 2003.
12. Felker G.M. et al. Underlying causes and long-term survival in patients with

- initially unexplained cardiomyopathy. // *N. Engl. J. Med.* 2000. Vol. 342, № 15. P. 1077–1084.
13. Ro A., Frishman W.H. Peripartum cardiomyopathy. // *Cardiol. Rev.* Vol. 14, № 1. P. 35–42.
  14. James P.R. A review of peripartum cardiomyopathy. // *Int. J. Clin. Pract.* 2004. Vol. 58, № 4. P. 363–365.
  15. Vukusic S. et al. Pregnancy and multiple sclerosis: The children of PRIMS // *Clin. Neurol. Neurosurg.* Elsevier, 2006. Vol. 108, № 3. P. 266–270.
  16. Vukusic S. et al. Pregnancy and multiple sclerosis (the PRIMS study): clinical predictors of post-partum relapse. // *Brain.* Oxford University Press, 2004. Vol. 127, № Pt 6. P. 1353–1360.
  17. van Walderveen M.A. et al. Magnetic resonance evaluation of disease activity during pregnancy in multiple sclerosis. // *Neurology.* 1994. Vol. 44, № 2. P. 327–329.
  18. Runmarker B., Andersen O. Pregnancy is associated with a lower risk of onset and a better prognosis in multiple sclerosis. // *Brain.* 1995. P. 253–261.
  19. Ponsonby A.-L. et al. Offspring number, pregnancy, and risk of a first clinical demyelinating event: the AusImmune Study. // *Neurology.* 2012. Vol. 78, № 12. P. 867–874.
  20. Liu S. et al. Strategies to Optimize Adult Stem Cell Therapy for Tissue Regeneration. // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. Vol. 17, № 6.
  21. Ishii T., Eto K. Fetal stem cell transplantation: Past, present, and future. // *World J. Stem Cells.* Baishideng Publishing Group Inc, 2014. Vol. 6, № 4. P. 404–420.
  22. Bianchi D.W. et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. Vol. 93, № 2. P. 705–708.
  23. Nassar D., Khosrotehrani K., Aractingi S. Fetal microchimerism in skin wound healing. // *Chimerism.* Landes Bioscience, 2012. Vol. 3, № 2. P. 45–47.

24. Kara R.J. et al. Fetal Cells Traffic to Injured Maternal Myocardium and Undergo Cardiac Differentiation Novelty and Significance // *Circ. Res.* Lippincott Williams & Wilkins, 2012. Vol. 110, № 1. P. 82–93.
25. Zeng X.X. et al. Pregnancy-associated progenitor cells differentiate and mature into neurons in the maternal brain. // *Stem Cells Dev.* 2010. Vol. 19, № 12. P. 1819–1830.
26. Khosrotehrani K. et al. Fetal cells participate over time in the response to specific types of murine maternal hepatic injury. // *Hum. Reprod.* 2007. Vol. 22, № 3. P. 654–661.
27. Kleeberger W. et al. Increased chimerism of bronchial and alveolar epithelium in human lung allografts undergoing chronic injury. // *Am. J. Pathol.* American Society for Investigative Pathology, 2003. Vol. 162, № 5. P. 1487–1494.
28. Conboy I.M., Rando T.A. Aging, stem cells and tissue regeneration: lessons from muscle. // *Cell Cycle.* 2005. Vol. 4, № 3. P. 407–410.
29. Conboy I.M. et al. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment // *Nature.* Nature Publishing Group, 2005. Vol. 433, № 7027. P. 760–764.
30. Villeda S.A. et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. // *Nat. Med.* 2014. Vol. 20, № 6. P. 659–663.
31. Villeda S.A. et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. // *Nature.* 2011. Vol. 477, № 7362. P. 90–94.
32. Katsimpardi L. et al. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. // *Science.* 2014. Vol. 344, № 6184. P. 630–634.
33. Ruckh J.M. et al. Rejuvenation of regeneration in the aging central nervous system. // *Cell Stem Cell.* 2012. Vol. 10, № 1. P. 96–103.
34. Olson K.A. et al. Association of growth differentiation factor 11/8, putative

- anti-ageing factor, with cardiovascular outcomes and overall mortality in humans: analysis of the Heart and Soul and HUNT3 cohorts. // *Eur. Heart J.* 2015. Vol. 36, № 48. P. 3426–3434.
35. Popkov V.A. et al. Diseases and Aging: Gender Matters. // *Biochem.* 2015. Vol. 80, № 12. P. 1560–1570.
  36. World Health Organisation // WHO. World Health Organization, 2017.
  37. Anand S.S. et al. Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. // *Eur. Heart J.* 2008. Vol. 29, № 7. P. 932–940.
  38. Hochman J.S. et al. Outcome and profile of women and men presenting with acute coronary syndromes: A report from TIMI IIIB // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997. Vol. 30. P. 141–148.
  39. Heer T. et al. Gender differences in acute non-ST-segment elevation myocardial infarction. // *Am. J. Cardiol.* 2006. Vol. 98. P. 160–166.
  40. Deswal A., Bozkurt B. Comparison of Morbidity in Women Versus Men With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction // *Am. J. Cardiol.* 2006. Vol. 97. P. 1228–1231.
  41. Dimitrow P. et al. Sex differences in age at onset of symptoms in patients with hypertrophic cardiomyopathy // *J. Cardiovasc. Risk.* 1997. P. 33–35.
  42. Humphries K.H. et al. New-onset atrial fibrillation: sex differences in presentation, treatment, and outcome. // *Circulation.* 2001. Vol. 103. P. 2365–2370.
  43. Costenbader K.H. et al. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women // *Arthritis Rheum.* 2007. Vol. 56. P. 1251–1262.
  44. Sandberg K. Mechanisms underlying sex differences in progressive renal disease. // *Gend. Med. Off. J. Partnersh. Gender-Specific Med. Columbia Univ.* 2008. Vol. 5. P. 10–23.
  45. Grodstein F. et al. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. // *N. Engl. J. Med.* 1996. Vol. 335. P. 453–461.

46. Harrison-Bernard L.M., Raij L. Postmenopausal hypertension // *Curr. Hypertens. Rep.* 2000. Vol. 2. P. 202–207.
47. Rosen C.J. Postmenopausal Osteoporosis // *Bone.* 2005. Vol. 8. P. 595–603.
48. Szekacs B. et al. Postmenopausal hormone replacement improves proteinuria and impaired creatinine clearance in type 2 diabetes mellitus and hypertension. // *BJOG.* 2000. Vol. 107. P. 1017–1021.
49. Cavasin M.A. et al. Testosterone enhances early cardiac remodeling after myocardial infarction, causing rupture and degrading cardiac function. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006. Vol. 290. P. H2043–H2050.
50. Singh H. et al. Vascular cytochrome P450 4A expression and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis contribute to endothelial dysfunction in androgen-induced hypertension // *Hypertension.* 2007. Vol. 50. P. 123–129.
51. Bae S., Zhang L. Gender Differences in Cardioprotection against Ischemia / Reperfusion Injury in Adult Rat Hearts : Focus on Akt and Protein Kinase C Signaling // *Pharmacology.* 2005. Vol. 315. P. 1125–1135.
52. Hsieh Y.-C. et al. Inhibition of cardiac PGC-1alpha expression abolishes ERbeta agonist-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage. // *FASEB J.* 2006. Vol. 20. P. 1109–1117.
53. Gold J.J., Josimovich J.B. *Gynecologic endocrinology.* Plenum Medical Book Co, 1987. 692 p.
54. Xiao J. et al. Pregnancy-induced physiological hypertrophy protects against cardiac ischemia-reperfusion injury // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014.
55. Lee J. et al. Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases // *Chonnam Med. J.* 2016.
56. Beurel E., Grieco S.F., Jope R.S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases // *Pharmacol. Ther. Pharmacol Ther,* 2015. Vol. 148. P. 114–131.
57. Smith G.A. et al. Vascular endothelial growth factors: multitasking functionality in metabolism, health and disease // *Journal of Inherited*

- Metabolic Disease. 2015.
58. Sun X.F., Zhang H. NFKB and NFKBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases // *Histology and Histopathology*. 2007.
  59. Hybertson B.M., Gao B. Role of the Nrf2 signaling system in health and disease // *Clinical Genetics*. 2014.
  60. Johnson S.C. et al. Modulating mTOR in aging and health // *Aging and Health - A Systems Biology Perspective*. 2014.
  61. Sorenson C.M. Bcl-2 family members and disease. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2004.
  62. Chen J. et al. The key regulatory roles of the PI3K/Akt signalling pathway in the functionalities of mesenchymal stem cells and applications in tissue regeneration // *Tissue Eng. Part B Rev*. 2013.
  63. Vellai T. et al. Genetics: Influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans* // *Nature*. 2003.
  64. Chen C. et al. MTOR regulation and therapeutic rejuvenation of aging hematopoietic stem cells // *Sci. Signal*. 2009.
  65. Harrison D.E. et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice // *Nature*. *Nature*, 2009. Vol. 460, № 7253. P. 392–395.
  66. Balistreri C.R. et al. The emerging role of Notch pathway in ageing: Focus on the related mechanisms in age-related diseases // *Ageing Research Reviews*. 2016.
  67. Kirkwood T.B., Holliday R. The evolution of ageing and longevity // *Proc R Soc Lond. B Biol Sci*. 1979. Vol. 205, № 1161. P. 531–546.
  68. Austad S.N. Retarded senescence in an insular population of Virginia opossums (*Didelphis virginiana*) // *J. Zool*. Blackwell Publishing Ltd, 1993. Vol. 229, № 4. P. 695–708.
  69. Reznick D., Butler Iv M.J., Rodd H. Life-history evolution in guppies. VII. The comparative ecology of high- and low-predation environments. // *Am. Nat*. 2001. Vol. 157, № 2. P. 126–140.

70. Min K.-J. et al. The lifespan of Korean eunuchs // *Curr. Biol.* Elsevier, 2012. Vol. 22, № 18. P. R792–R793.
71. Westendorp R.G.J., Kirkwood T.B.L. Human longevity at the cost of reproductive success // *Nature*. Nature Publishing Group, 1998. Vol. 396, № 6713. P. 743–746.
72. Chereji E. et al. Reexamining the Association Between Fertility and Longevity: Testing the Disposable Soma Theory in a Modern Human Sample of Twins // *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* Oxford University Press, 2013. Vol. 68, № 5. P. 499–509.
73. Helle S., Lummaa V., Jokela J. Are reproductive and somatic senescence coupled in humans? Late, but not early, reproduction correlated with longevity in historical Sami women. // *Proc. Biol. Sci. The Royal Society*, 2005. Vol. 272, № 1558. P. 29–37.
74. McArdle P.F. et al. Does having children extend life span? A genealogical study of parity and longevity in the Amish. // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* Oxford University Press, 2006. Vol. 61, № 2. P. 190–195.
75. Gagnon A. et al. Is there a trade-off between fertility and longevity? A comparative study of women from three large historical databases accounting for mortality selection // *Am. J. Hum. Biol.* Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2009. Vol. 21, № 4. P. 533–540.
76. Smith K.R., Mineau G.P., Bean L.L. Fertility and post-reproductive longevity // *Biodemography Soc. Biol.* Taylor & Francis Group, 2002. Vol. 49, № 3–4. P. 185–205.
77. Grundy E., Tomassini C. Fertility history and health in later life: a record linkage study in England and Wales // *Soc. Sci. Med.* 2005. Vol. 61, № 1. P. 217–228.
78. Jaffe D. et al. Influence of late-age births on maternal longevity // *Ann. Epidemiol.* Elsevier, 2015. Vol. 25, № 6. P. 387–391.
79. Sarkar S., Plutynski A. *A companion to the philosophy of biology.* Blackwell Pub, 2008. 589 p.

80. Whitehead H. et al. Life History Evolution: What Does a Menopausal Killer Whale Do? // *Curr. Biol.* Elsevier, 2015. Vol. 25, № 6. P. R225–R227.
81. Bailey R.R., Rolleston G.L. KIDNEY LENGTH AND URETERIC DILATATION IN THE PUERPERIUM // *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* 1971. Vol. 78, № 1. P. 55–61.
82. Rasmussen P.E., Nielsen F.R. Hydronephrosis during pregnancy: a literature survey // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1988. Vol. 27, № 3. P. 249–259.
83. Dunlop W. Serial changes in renal haemodynamics during normal human pregnancy. // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1981. Vol. 88, № 1. P. 1–9.
84. Gordon M. et al. Perinatal outcome and long-term follow-up associated with modern management of diabetic nephropathy. // *Obstet. Gynecol.* 1996. Vol. 87, № 3. P. 401–409.
85. CHESLEY L.C., VALENTI C., REIN H. Excretion of sodium loads by nonpregnant and pregnant normal, hypertensive and pre-eclamptic women. // *Metabolism.* 1958. Vol. 7, № 5. P. 575–588.
86. Davison J.M. et al. Influence of humoral and volume factors on altered osmoregulation of normal human pregnancy. // *AJP Ren. Physiol.* 1990. Vol. 258, № 4 Pt 2. P. F900–F907.
87. Weisinger R.S. et al. Relaxin alters the plasma osmolality arginine vasopressin relationship in the rat // *J. Endocrinol.* 1993. Vol. 137, № 3. P. 505–510.
88. Ohara M. et al. Upregulation of aquaporin 2 water channel expression in pregnant rats. // *J. Clin. Invest.* 1998. Vol. 101, № 5. P. 1076–1083.
89. Chapman A.B. et al. Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy // *Kidney Int.* 1998. Vol. 54, № 6. P. 2056–2063.
90. Poppas A. et al. Serial assessment of the cardiovascular system in normal pregnancy: Role of arterial compliance and pulsatile arterial load // *Circulation.* 1997. Vol. 95, № 10. P. 2407–2415.

91. Elsheikh A. et al. The renin-aldosterone system during normal and hypertensive pregnancy // *Arch. Gynecol. Obstet.* 2001. Vol. 264, № 4. P. 182–185.
92. Khraibi A.A. Renal interstitial hydrostatic pressure and sodium excretion in hypertension and pregnancy. // *J. Hypertens. Suppl.* 2002. Vol. 20, № 3. P. S21-7.
93. Sifakis S., Pharmakides G. Anemia in pregnancy. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000. Vol. 900. P. 125–136.
94. Gant N.F. et al. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy // *J. Clin. Invest.* 1973. Vol. 52, № 11. P. 2682–2689.
95. McGuane J.T. et al. Role of relaxin in maternal systemic and renal vascular adaptations during gestation // *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2009. Vol. 1160. P. 304–312.
96. Lindheimer M.D. Unraveling the mysteries of preeclampsia // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2005. Vol. 193, № 1. P. 3–4.
97. Bellomo R., Kellum J.A., Ronco C. Acute kidney injury // *Lancet.* 2012. Vol. 380, № 9843. P. 756–766.
98. Mehta R.L. et al. International Society of Nephrology's 0by25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology // *Lancet.* 2015. Vol. 385, № 9987. P. 2616–2643.
99. Thuillier R. et al. Thrombin inhibition during kidney ischemia-reperfusion reduces chronic graft inflammation and tubular atrophy. // *Transplantation.* 2010. Vol. 90, № 6. P. 612–621.
100. Versteilen A.M.G. et al. Rho-Kinase Inhibition Reduces Early Microvascular Leukocyte Accumulation in the Rat Kidney following Ischemia-Reperfusion Injury: Roles of Nitric Oxide and Blood Flow // *Nephron Exp. Nephrol.* 2011. Vol. 118, № 4. P. e79–e86.
101. Kwon O., Hong S.-M., Ramesh G. Diminished NO generation by injured endothelium and loss of macula densa nNOS may contribute to sustained acute kidney injury after ischemia-reperfusion // *Am. J. Physiol. Physiol.*

2009. Vol. 296, № 1. P. F25–F33.
102. Kato N. et al. The E-Selectin Ligand Basigin/CD147 Is Responsible for Neutrophil Recruitment in Renal Ischemia/Reperfusion // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009. Vol. 20, № 7. P. 1565–1576.
  103. Thurman J.M. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion // *Clin. Immunol.* 2007. Vol. 123, № 1. P. 7–13.
  104. Pulskens W.P. et al. Toll-Like Receptor-4 Coordinates the Innate Immune Response of the Kidney to Renal Ischemia/Reperfusion Injury // *PLoS One* / ed. Zimmer J. 2008. Vol. 3, № 10. P. e3596.
  105. Skorecki K. et al. Brenner & Rector's the kidney.
  106. Zuk A. et al. Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney. // *Am. J. Physiol.* 1998. Vol. 275, № 3 Pt 1. P. C711-31.
  107. Lameire N., Biesen W. Van, Vanholder R. Acute kidney injury // *Lancet.* Elsevier, 2008. Vol. 372, № 9653. P. 1863–1865.
  108. Saikumar P., Venkatachalam M.A. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. // *Semin. Nephrol.* 2003. Vol. 23, № 6. P. 511–521.
  109. Acharya A. et al. Acute Kidney Injury in Pregnancy—Current Status // *Adv. Chronic Kidney Dis.* 2013. Vol. 20, № 3. P. 215–222.
  110. World Health Organization. World health report 2005: make every mother and child count // *World Health.* 2005. 219 p.
  111. Clark S.L. et al. Maternal death in the 21st century: causes, prevention, and relationship to cesarean delivery // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008. Vol. 199, № 1.
  112. Skjærven R., Wilcox A., Lie R. The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia // *New Engl. J. ....* 2002. Vol. 346, № 1. P. 33–38.
  113. Hauth J.C. et al. Pregnancy outcomes in healthy nulliparas who developed hypertension // *Obstet. Gynecol.* 2000. Vol. 95, № 1. P. 24–28.
  114. Carr D.B. et al. A sister's risk: Family history as a predictor of preeclampsia // *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2005. Vol. 193, № 3

SUPPL. P. 965–972.

115. Laivuori H. et al. Susceptibility loci for preeclampsia on chromosomes 2p25 and 9p13 in Finnish families. // *Am. J. Hum. Genet.* 2003. Vol. 72, № 1. P. 168–177.
116. Arngrímsson R. et al. A genome-wide scan reveals a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia on chromosome 2p13 // *Hum. Mol. Genet.* 1999. Vol. 8, № 9. P. 1799–1805.
117. Tuohy J.F., James D.K. Pre-Eclampsia and Trisomy-13 // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1992. Vol. 99, № 11. P. 891–894.
118. Edlow A.G., Srinivas S.K., Elovitz M.A. Investigating the risk of hypertension shortly after pregnancies complicated by preeclampsia // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2009. Vol. 200, № 5.
119. Callaway L.K. et al. Diabetes mellitus in the 21 years after a pregnancy that was complicated by hypertension: findings from a prospective cohort study // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2007. Vol. 197, № 5.
120. McDonald S.D. et al. Cardiovascular sequelae of preeclampsia/eclampsia: A systematic review and meta-analyses // *Am. Heart J.* 2008. Vol. 156, № 5. P. 918–930.
121. Bellamy L. et al. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. // *BMJ.* 2007. Vol. 335, № 7627. P. 974.
122. Vikse B.E. et al. Preeclampsia and the risk of End-Stage renal disease // *Obstetrical and Gynecological Survey.* 2009. Vol. 64, № 1. P. 2–4.
123. Duckitt K., Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: Systematic review of controlled studies // *British Medical Journal.* 2005. Vol. 330, № 7491. P. 565–567.
124. Mostello D. et al. Preeclampsia in the parous woman: Who is at risk? // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2002. Vol. 187, № 2. P. 425–429.
125. Eskenazi B., Fenster L., Sidney S. A multivariate analysis of risk factors for preeclampsia // *Jama.* 1991. Vol. 266, № 2. P. 237–241.

126. Zetterström K. et al. Maternal complications in women with chronic hypertension: A population-based cohort study // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2005. Vol. 84, № 5. P. 419–424.
127. Palmer S.K. et al. Altered blood pressure course during normal pregnancy and increased preeclampsia at high altitude (3100 meters) in Colorado // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999. Vol. 180, № 5. P. 1161–1168.
128. Krotz S. et al. Hypertensive disease in twin pregnancies: A review // *Twin Research.* 2002. Vol. 5, № 1. P. 8–14.
129. Ness R.B. et al. Family history of hypertension, heart disease, and stroke among women who develop hypertension in pregnancy // *Obstet. Gynecol.* 2003. Vol. 102, № 6. P. 1366–1371.
130. Clowse M.E.B. et al. A national study of the complications of lupus in pregnancy // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008. Vol. 199, № 2.
131. Weiss J.L. et al. Obesity, obstetric complications and cesarean delivery rate—a population-based screening study // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004. Vol. 190, № 4. P. 1091–1097.
132. DeVader S.R. et al. Evaluation of gestational weight gain guidelines for women with normal prepregnancy body mass index // *Obstet. Gynecol.* 2007. Vol. 110, № 4. P. 745–751.
133. Zandi-Nejad K., Luyckx V.A., Brenner B.M. Adult hypertension and kidney disease: The role of fetal programming // *Hypertension.* 2006. Vol. 47, № 3 II. P. 502–508.
134. Aksu U., Demirci C., Ince C. The pathogenesis of acute kidney injury and the toxic triangle of oxygen, reactive oxygen species and nitric oxide // *Controversies in Acute Kidney Injury.* 2011.
135. Molitoris B.A. Therapeutic translation in acute kidney injury: The epithelial/endothelial axis // *Journal of Clinical Investigation.* 2014.
136. Basile D.P. et al. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function // *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 2001.

137. Inagi R. Endoplasmic reticulum stress in the kidney as a novel mediator of kidney injury // *Nephron - Experimental Nephrology*. 2009.
138. Hodeify R. et al. Gender differences control the susceptibility to ER stress-induced acute kidney injury // *AJP Ren. Physiol*. 2013.
139. Pallet N. et al. Endoplasmic reticulum stress: An unrecognized actor in solid organ transplantation // *Transplantation*. 2009.
140. Peyrou M., Hanna P.E., Cribb A.E. Cisplatin, gentamicin, and p-aminophenol induce markers of endoplasmic reticulum stress in the rat kidneys // *Toxicol. Sci*. 2007.
141. Bando Y. et al. ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. // *FASEB J*. 2004.
142. Gao X. et al. The Nephroprotective Effect of Tauroursodeoxycholic Acid on Ischaemia/Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. 2012.
143. Dong B. et al. Ischemia/reperfusion-induced chop expression promotes apoptosis and impairs renal function recovery: The role of acidosis and gpr4 e110944 // *PLoS One*. 2014.
144. Raturi A., Simmen T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: The mitochondria-associated membrane (MAM) // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2013.
145. Linnane A.W., Kios M., Vitetta L. Healthy aging: regulation of the metabolome by cellular redox modulation and prooxidant signaling systems: the essential roles of superoxide anion and hydrogen peroxide // *Biogerontology*. 2007. Vol. 8, № 5. P. 445–467.
146. Brandon M., Baldi P., Wallace D.C. Mitochondrial mutations in cancer // *Oncogene*. 2006. Vol. 25, № 34. P. 4647–4662.
147. Valko M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2007. Vol. 39, № 39. P. 44–84.
148. Sanger N. et al. Cell cycle-related expression and ligand binding of

- peripheral benzodiazepine receptor in human breast cancer cell lines. // *Eur. J. Cancer*. 2000. Vol. 36, № 16. P. 2157–2163.
149. Smith J. et al. Redox state is a central modulator of the balance between self-renewal and differentiation in a dividing glial precursor cell // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. Vol. 97, № 18. P. 10032–10037.
150. Wang F.S. et al. Ras Induction of Superoxide Activates ERK-dependent Angiogenic Transcription Factor HIF-1 $\alpha$  and VEGF-A Expression in Shock Wave-stimulated Osteoblasts // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 11. P. 10331–10337.
151. Sundaresan M. et al. Requirement for Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction // *Science*. 1995. Vol. 270, № 5234. P. 296–299.
152. Kroemer G., Dallaporta B. the Mitochondrial Death / Life Regulator in Apoptosis and Necrosis // *Annu. Rev. Physiol.* 1998. Vol. 60. P. 619–642.
153. Tsujimoto Y., Shimizu S. Bcl-2 family: Life-or-death switch // *FEBS Letters*. 2000. Vol. 466, № 1. P. 6–10.
154. Haunstetter A., Izumo S. Future perspectives and potential implications of cardiac myocyte apoptosis // *Cardiovascular Research*. 2000. Vol. 45, № 3. P. 795–801.
155. Kidd V.J. Proteolytic activities that mediate apoptosis. // *Annu. Rev. Physiol.* 1998. Vol. 60. P. 533–573.
156. Soltoff S.P. ATP and the Regulation of Renal Cell Function // *Annu. Rev. Physiol.* 1986. Vol. 48, № 1. P. 9–31.
157. Silachev D.N. et al. The Mitochondrion as a Key Regulator of Ischaemic Tolerance and Injury // *Hear. Lung Circ. United Kingdom: United Kingdom*, 2014. Vol. 23, № 10. P. 897–904.
158. Linkermann A. et al. Regulated Cell Death in AKI. // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014.
159. Thadhani R., Pascual M., Bonventre J. V. Acute Renal Failure // *N. Engl. J. Med.* 1996. Vol. 334, № 22. P. 1448–1460.

160. Venkatachalam M.A., Weinberg J.M. The tubule pathology of septic acute kidney injury: A neglected area of research comes of age // *Kidney International*. 2012.
161. Brooks C. et al. Regulation of mitochondrial dynamics in acute kidney injury in cell culture and rodent models // *J. Clin. Invest.* 2009.
162. Zhan M. et al. Mitochondrial dynamics: Regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology // *Kidney International*. 2013.
163. NOHL H., JORDAN W. The Metabolic Fate of Mitochondrial Hydrogen Peroxide // *Eur. J. Biochem.* 1980. Vol. 111, № 1. P. 203–210.
164. Fleury C., Mignotte B., Vayssiere J.L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling // *Biochimie*. 2002. Vol. 84, № 2–3. P. 131–141.
165. Thannickal V.J., Fanburg B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000. Vol. 279, № 6. P. L1005-28.
166. Bae G.U. et al. Hydrogen peroxide activates p70(S6k) signaling pathway // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 46. P. 32596–32602.
167. Jiali Tang † et al. Mitochondrial Reduction of Metmyoglobin: Dependence on the Electron Transport Chain. American Chemical Society , 2005.
168. Ogawa T. et al. Contribution of nitric oxide to the protective effects of ischemic preconditioning in ischemia-reperfused rat kidneys // *J. Lab. Clin. Med.* 2001. Vol. 138, № 1. P. 50–58.
169. Vanden Hoek T. et al. Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion // *Circ Res.* 2000. Vol. 86, № 5. P. 541–548.
170. Juhaszova M. et al. Role of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cardioprotection // *Circulation Research*. 2009. Vol. 104, № 11. P. 1240–1252.
171. Ross a D. et al. Effect of antithyroid drugs on hydroxyl radical formation and alpha-1-proteinase inhibitor inactivation by neutrophils: therapeutic implications. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998. Vol. 285, № 3. P. 1233–1238.
172. Roots R., Okada S. Estimation of Life Times and Diffusion Distances of Radicals Involved in X-Ray-Induced DNA Strand Breaks or Killing of

- Mammalian Cells // *Radiat. Res.* 1975. Vol. 64, № 2. P. 306–320.
173. Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress // *FEBS Letters*. 2001. Vol. 495, № 1–2. P. 12–15.
174. Gottlieb R.A. Mitochondria: execution central. // *FEBS Lett.* 2000. Vol. 482, № 1–2. P. 6–12.
175. Kroemer G., Dallaporta B. the Mitochondrial Death / Life Regulator in Apoptosis and Necrosis // *Annu. Rev. Physiol.* 1998. Vol. 60. P. 619–642.
176. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. // *Biochem. J.* 1999. Vol. 341 ( Pt 2). P. 233–249.
177. Gottlieb R.A. Mitochondria: execution central. // *FEBS Lett.* 2000. Vol. 482, № 1–2. P. 6–12.
178. Koc E.C. et al. Identification of four proteins from the small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome using a proteomics approach // *Protein Sci.* 2001. Vol. 10, № 3. P. 471–481.
179. Earnshaw W.C. A cellular poison cupboard // *Nature*. 1999. Vol. 397, № 6718. P. 387–389.
180. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. & Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. // *Nature*. 1999. Vol. 397, № 6718. P. 441–446.
181. Tallini G. Oncocytic tumours // *Virchows Archiv.* 1998. Vol. 433, № 1. P. 5–12.
182. Li W. et al. Peripheral-type benzodiazepine receptor overexpression and knockdown in human breast cancer cells indicate its prominent role in tumor cell proliferation // *Biochem. Pharmacol.* 2007. Vol. 73, № 4. P. 491–503.
183. Virbasius C.M.A., Virbasius J. V., Scarpulla R.C. NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators // *Genes Dev.*

- 1993.
184. Virbasius J. V., Virbasius C.A., Scarpulla R.C. Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for and ETS domain activator of viral promoters // *Genes Dev.* 1993.
185. Bereiter-Hahn J., Vöth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. // *Microsc. Res. Tech.* 1994. Vol. 27, № 3. P. 198–219.
186. Chan D.C. Mitochondrial fusion and fission in mammals. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, California, USA. dchan@caltech.edu DOI - 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104638 SRC - Pubmed ID2 - 16704336 FG - 0, 2006. Vol. 22. P. 79–99.
187. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2010.
188. Archer S.L. Mitochondrial Dynamics — Mitochondrial Fission and Fusion in Human Diseases // *N. Engl. J. Med.* 2013.
189. Youle R.J., Van Der Blik A.M. Mitochondrial fission, fusion, and stress // *Science.* 2012.
190. Zorov D.B. et al. Mitochondrial Aging: Is There a Mitochondrial Clock? // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2017. Vol. 72, № 9. P. 1171–1179.
191. O’Toole J.F. Renal manifestations of genetic mitochondrial disease // *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease.* 2014.
192. Liang H., Ward W.F. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. // *Adv. Physiol. Educ.* 2006.
193. Rasbach K. a, Schnellmann R.G. PGC-1alpha over-expression promotes recovery from mitochondrial dysfunction and cell injury. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007.
194. Tran M. et al. PGC-1 $\alpha$  promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice. // *J. Clin. Invest.* 2011.

195. Funk J.A., Schnellmann R.G. Persistent disruption of mitochondrial homeostasis after acute kidney injury // *AJP Ren. Physiol.* 2012.
196. Jesinkey S.R. et al. Formoterol Restores Mitochondrial and Renal Function after Ischemia-Reperfusion Injury // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014.
197. Garrett S.M. et al. Agonism of the 5-Hydroxytryptamine 1F Receptor Promotes Mitochondrial Biogenesis and Recovery from Acute Kidney Injury // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2014.
198. Whitaker R.M. et al. cGMP-Selective Phosphodiesterase Inhibitors Stimulate Mitochondrial Biogenesis and Promote Recovery from Acute Kidney Injury // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2013.
199. Gall J.M. et al. Role of mitofusin 2 in the renal stress response // *PLoS One.* 2012.
200. Ishihara M. et al. Sestrin-2 and BNIP3 regulate autophagy and mitophagy in renal tubular cells in acute kidney injury // *Am. J. Physiol. Physiol.* 2013.
201. Jiang M. et al. Autophagy in proximal tubules protects against acute kidney injury // *Kidney Int. Kidney Int*, 2012. Vol. 82, № 12. P. 1271–1283.
202. He L., Livingston M.J., Dong Z. Autophagy in acute kidney injury and repair // *Nephron - Clinical Practice.* 2014.
203. Bonventre J. V., Zuk A. Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease? // *Kidney International.* 2004.
204. Jang H.R., Rabb H. Immune cells in experimental acute kidney injury // *Nature Reviews Nephrology.* 2015.
205. Kinsey G.R., Okusa M.D. Role of leukocytes in the pathogenesis of acute kidney injury // *Critical Care.* 2012.
206. Ysebaert D.K. et al. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury // *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000.
207. Zuk A. et al. CXCR4 antagonism as a therapeutic approach to prevent acute kidney injury // *AJP Ren. Physiol.* 2014.
208. Gigliotti J.C. et al. Ultrasound Prevents Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Stimulating the Splenic Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway // *J. Am.*

- Soc. Nephrol. 2013.
209. Bonventre J. V. Dedifferentiation and Proliferation of Surviving Epithelial Cells in Acute Renal Failure // J. Am. Soc. Nephrol. 2003.
  210. Humphreys B.D. et al. Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors // Proc. Natl. Acad. Sci. 2011.
  211. Humphreys B.D. et al. Intrinsic Epithelial Cells Repair the Kidney after Injury // Cell Stem Cell. 2008.
  212. Ferenbach D.A., Bonventre J. V. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD // Nature Reviews Nephrology. 2015.
  213. Eardley K.S. et al. The relationship between albuminuria, MCP-1/CCL2, and interstitial macrophages in chronic kidney disease // Kidney Int. 2006.
  214. Humphreys B.D. et al. Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis // J. Clin. Invest. 2013.
  215. Yang L. et al. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury // Nat. Med. 2010.
  216. Barnes J.L., Glass W.F. Renal interstitial fibrosis: A critical evaluation of the origin of myofibroblasts // Experimental Models for Renal Diseases: Pathogenesis and Diagnosis. 2011.
  217. Koyner J.L. et al. Biomarkers Predict Progression of Acute Kidney Injury after Cardiac Surgery // J. Am. Soc. Nephrol. 2012.
  218. Mihara M., Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. // Anal. Biochem. 1978. Vol. 86, № 1. P. 271–278.
  219. Schindelin J. et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis // Nature Methods. 2012.
  220. Atienza J.M. et al. Dynamic and label-free cell-based assays using the real-time cell electronic sensing system. // Assay Drug Dev. Technol. 2006. Vol. 4, № 5. P. 597–607.
  221. Giaever I., Keese C.R. Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with

- an applied electric field // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1984. Vol. 81, № 12. P. 3761–3764.
222. Giaever I., Keese C.R. Micromotion of mammalian cells measured electrically. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1991. Vol. 88, № 17. P. 7896–7900.
223. Atienza J.M. et al. Dynamic and Label-Free Cell-Based Assays Using the Real-Time Cell Electronic Sensing System // Assay Drug Dev. Technol. 2006. Vol. 4, № 5. P. 597–607.
224. Atienza J.M. et al. Dynamic Monitoring of Cell Adhesion and Spreading on Microelectronic Sensor Arrays // J. Biomol. Screen. 2005. Vol. 10, № 8. P. 795–805.
225. Wegener J., Keese C.R., Giaever I. Electric Cell–Substrate Impedance Sensing (ECIS) as a Noninvasive Means to Monitor the Kinetics of Cell Spreading to Artificial Surfaces // Exp. Cell Res. 2000. Vol. 259, № 1. P. 158–166.
226. Johnson D., Lardy H. Isolation of liver or kidney mitochondria // Methods Enzymol. Academic Press, 1967. Vol. 10. P. 94–96.
227. Sharples E.J. et al. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion // J. Am. Soc. Nephrol. J Am Soc Nephrol, 2004. Vol. 15, № 8. P. 2115–2124.
228. Van Wauwe J., Haefner B. Glycogen synthase kinase-3 as drug target: from wallflower to center of attention. // Drug News Perspect. 2003. Vol. 16, № 9. P. 557–565.
229. Wang Y. et al. Fetal cells in mother rats contribute to the remodeling of liver and kidney after injury. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. Vol. 325, № 3. P. 961–967.
230. Popkov V.A. et al. Molecular and Cellular Interactions between Mother and Fetus. Pregnancy as a Rejuvenating Factor. // Biochemistry. (Mosc). 2016. Vol. 81, № 12. P. 1480–1487.
231. Kendrick J. et al. Kidney disease and maternal and fetal outcomes in

- pregnancy // *Am. J. Kidney Dis.* 2015.
232. Mertz D. et al. Pregnancy as a risk factor for severe outcomes from influenza virus infection: A systematic review and meta-analysis of observational studies // *Vaccine.* 2017.
233. Marder W., Somers E.C. Is pregnancy a risk factor for rheumatic autoimmune diseases? // *Current Opinion in Rheumatology.* 2014.
234. Shemin D., Dworkin L.D. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a Biomarker for Early Acute Kidney Injury // *Critical Care Clinics.* 2011.
235. Gawęł S. et al. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker // *Wiadomości Lek. (Warsaw, Pol. 1960).* 2004.
236. Hanif M.O., Ramphul K. Renal Tubular Necrosis, Acute // *StatPearls.* 2018.
237. Bien M.Y. et al. VEGF correlates with inflammation and fibrosis in tuberculous pleural effusion // *Sci. World J.* 2015.
238. Supino R. MTT assays. // *Methods Mol. Biol.* 1995.
239. Matsumoto K., Ema M. Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours // *Journal of Biochemistry.* 2014.
240. Chan S.J. et al. Endogenous regeneration: Engineering growth factors for stroke // *Neurochemistry International.* 2017.
241. Stevens A.M. Maternal microchimerism in health and disease // *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2016.
242. B'Chir W. et al. The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression // *Nucleic Acids Res.* 2013.
243. Zuk A., Bonventre J. V. Acute Kidney Injury // *Annu. Rev. Med.* 2016. Vol. 67, № 1. P. 293–307.