

На правах рукописи



МОТИН
Юрий Григорьевич

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ ДЕТЕРМИНАЦИИ НАРУШЕНИЙ
СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗА ПОЧКИ ПРИ
РАЗВИТИИ ОКСАЛАТНОГО НЕФРОЛИТИАЗА**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Барнаул – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Барнаул).

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук, профессор

Лепилов Александр Васильевич
Ларионов Петр Михайлович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
в.н.с. лаборатории экспериментальной
хирургии и морфологии Центра новых
технологий ФГБУ «СФБМИЦ
им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава
России

Волков Александр Михайлович

доктор медицинских наук, профессор,
зав. лабораторией инвазивных
медицинских технологий ФГБУН
ИХБФМ СО РАН

Морозов Виталий Валерьевич

доктор медицинских наук,
врач отделения урологии НУЗ ОКБ
на ст. Барнаул ОАО РЖД

Раздорская Мирослава Витальевна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Томск).

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2017 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.048.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2. Тел./факс: (383) 333-64-56

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения и на сайте http://centercem.ru/nauchnaya_deyatelnost/dissertacionnyj_sovet/

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Пальчикова Наталья Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Нефролитиаз – серьезная медицинская и социальная проблема, впервые клинически проявляется в наиболее трудоспособном возрасте (30-50 лет) и занимает одно из первых мест в мире по сравнению с другими урологическими заболеваниями (в России этот показатель равен 34,2%) (Тиктинский О.Л., 2000; Аляев Ю.Г., 2010; Daudon M., 2005; Romero V., 2010). Этиология и механизмы процессов литогенеза при мочекаменной болезни остаются актуальными, поскольку не до конца разрешены. Существующие теории объясняют лишь отдельные звенья патогенеза, при этом окончательно не установлено, действуют ли факторы, приводящие к нефролитиазу самостоятельно или совместно, в различных комбинациях и на разных временных этапах.

Инициация процессов камнеобразования и развивающиеся при этом структурные изменения почек у человека протекают в большинстве случаев бессимптомно. Это обуславливает необходимость экспериментального моделирования обсуждаемого патологического процесса, поскольку ясные представления о начальных этапах развития заболевания и особенностях литогенеза позволили бы сформулировать адекватные программы профилактики и метафилактики нефролитиаза. Наиболее адекватной и используемой является модель экспериментального оксалатного нефролитиаза (Голованов С.А., 2002; Жариков А.Ю. и др., 2008; Hoff W.G., 2004) так как в 75-85% случаев мочекаменной болезни у человека обнаруживаются кальциевые камни (Лопаткин Н.А., 2009), большинство из них (более 70-85%) являются оксалатными (Тиктинский О.Л., 2000; Переверзев А.С. и др. 2004.; Tiselius H., 1999; Evan A., 2009).

Степень разработанности темы исследования. Морфологические изменения, развивающиеся в почках на начальных этапах процессов кристаллизации, формирования мочевых камней в настоящее время изучены недостаточно. Полагают, что первоначальное образование микролитов связано с элементами петли нефрона, что обусловлено особенностями их морфологической организации, наличием противоточно-множительной системы (Evan A. et al., 2003) и замедлением тока мочи (Kok D., 1997). Отсутствует единое мнение о факторах повреждения эпителия канальцев нефронов и собирательных трубок в условиях гипероксалурии. Часть

исследователей полагают, что непосредственно повреждающий, токсический эффект на эпителиальные клетки оказывают кристаллы оксалата кальция (Schepers M.S., 2005; Guo C., 2007); другие связывают развитие повреждения клеток с первичным воздействием оксалат-иона (Khan S.R., 1995, 2004, 2006); по мнению ряда авторов оксалат-ион и кристаллы оксалата кальция повреждают клетки почки независимо друг от друга (Thamiselvan V. et al, 2009, 2014; Lee H.L. et al, 2012). Механизмы повреждающего действия оксалат-иона и кристаллов оксалата кальция так же до конца не ясны.

Особого внимания заслуживает возможная ранняя связь между развитием процессов литогенеза и оксидативного повреждения тканей почек: показана возможность нарушения редокс-баланса в почечном эпителии (Selvan R., 2002; Rashed T., 2004); высказано предположение об инициации процессов литогенеза образующимися активными формами кислорода (АФК) (Schwille P., 2005).

Обсуждается взаимосвязь процессов оксидативного повреждения и воспаления при развитии мочекаменной болезни. АФК регулируют многие кальций-зависимые сигнальные каскады, а также активность факторов транскрипции, в том числе ядерного фактора κB (NF- κB) (Chen F. et al., 1999; Khan S., 2014) – ключевого транскрипционного регулятора генов, вовлеченных в воспалительный ответ (Pahl H., 1995). АФК вызывают повреждение клеток и их гибель, опосредуют образование мембранных везикул, которые поддерживают процессы нуклеации кристаллов (Khan S. et al., 2002; Talham D. et al., 2006).

Изменение клеточных редокс-зависимых реакций может способствовать нарушению нормального фолдинга белков в гранулярном эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР). Избыточное накопление неправильно свернутых протеинов в элементах ЭПР получило название «стресс эндоплазматического ретикулума» (ЭР-стресс) (Зверев Я.Ф., Брюханов В.М., 2012). В настоящее время определена связь между оксидативным повреждением и ЭР-стрессом. При этом часть авторов иницирующим фактором этих процессов считают оксидативный стресс (Yokouchi M. et al., 2008), другие – ЭР-стресс (Cullinan S., 2006). Современные данные позволяют рассматривать дисфункцию ЭПР и развитие ЭР-стресса как общее звено многих заболеваний человека, в том числе патологии почек. Несмотря на значительное количество работ, посвященных

изучению ЭР-стресса в почке при ряде заболеваний (врожденные и наследственные заболевания, поликистоз почек, гломерулонефриты, диабетическая нефропатия, повреждение вызванное ишемией/реперфузией и др.), в современной литературе недостаточно освещены вопросы развития ЭР-стресса и его проявления при нефролитолизе.

Необходимо отметить, что у здорового человека в условиях транзиторной гипероксалурии и повышенного содержания в моче солей кальция процессы кристаллизации и литогенеза не развиваются в силу присутствия в моче специфических белковых макромолекул – внутрипочечных ингибиторов кристаллизации (Khan S.R., Kok D.J., 2004; Kumar V., Lieske J.C., 2006). Эти макромолекулярные соединения не только ингибируют процессы нуклеации кристаллов, их рост и агрегацию (Khan S., 2014), но и вовлечены в воспалительный ответ: бикунин является ингибитором протеиназ и оказывает стабилизирующее действие на экстрацеллюлярный матрикс (Mizon C. et al., 2003;); белок Тамма-Хорсфалла оказывает ренопротективный эффект и определяется в почечном интерстиции при ряде заболеваний (Rampoldi L. et al., 2011); остеопонтин как хемоаттрактант вовлекается в процессы воспаления и фиброза (Mazzali M. et al., 2002; Urtasun R. et al., 2012). Высказано предположение, что образующиеся в условиях редокс-дисбаланса внутрипочечные ингибиторы кристаллизации вследствие воздействия на них АФК не способны осуществлять свои защитные функции в препятствии адгезии и росту кристаллов (Khan S., 2014).

Таким образом, имеющихся данных очевидно недостаточно для формулирования единой концепции этиопатогенеза нефролитолиза. Полиметодическое исследование функциональных и структурных изменений, обусловленных локальными воздействиями соединений кальция и развитием воспалительной реакции тканей, активных форм кислорода и каскадов стресса эндоплазматического ретикулума могла бы не только серьезно углубить наши знания относительно ранних этапов развития оксалатного нефролитолиза, но и наметить новые стратегические возможности для его патогенетически обоснованной профилактики и лечения.

Цель исследования. Исследовать молекулярно-клеточные проявления нарушений гомеостаза, детерминирующих развитие оксалатного нефролитолиза в эксперименте.

Задачи исследования.

1. Изучить цито- и гистотопографические особенности образования кальциевых депозитов, общие закономерности структурных изменений почки на ранних этапах литогенеза при экспериментальном нефролитиазе.

2. Исследовать особенности структурных проявлений оксидативного повреждения на ранних этапах экспериментального нефролитиаза.

3. Изучить вероятную роль провоспалительного эффекта кристаллов кальция при нефролитиазе путем изучения экспрессии транскрипционного регулятора генов, вовлеченных в воспалительный ответ (NF- κ B).

4. Изучить особенности и выраженность экспрессии маркеров адаптивной и дизадаптивной ветвей стресса эндоплазматического ретикулума на ранних этапах развития оксалатного нефролитиаза.

5. Методами иммуногистохимии изучить экспрессию внутрипочечных ингибиторов кристаллизации (протеин Тамма-Хорсфалла, остеопонтин, бикунин) на ранних этапах литогенеза.

6. Исследовать вероятность причастности оксидативного стресса к формированию конкрементов в почках посредством выполнения гистологического, электронномикроскопического и иммуногистохимического исследований почки в условиях коррекции перекисного окисления липидов α -токоферолом.

7. Изучить особенности процессов кристаллизации и морфофункциональной перестройки почки в условиях применения хелатирующих соединений (цитрат натрия).

Научная новизна. Показано, что в условиях гипероксалурии ведущая роль в инициации и прогрессировании процессов камнеобразования принадлежит элементам петли нефронов и собирательным трубкам наружной и внутренней зоны мозгового вещества почки в связи с первично интраэпителиальным отложением депозитов кальция.

Впервые методом иммуногистохимии в почках при моделировании экспериментального оксалатного нефролитиаза показана гистотопографическая связь процессов кристаллизации, литогенеза и развития процессов свободно-радикального окисления при снижении

функциональной возможности системы ферментной антиоксидантной защиты.

Изучены особенности экспрессии транскрипционного регулятора генов, вовлеченных в воспалительный ответ (NF- κ B) в связи с процессами кристаллизации в тканях почки на ранних сроках литогенеза. Установлена прямая корреляционная связь между уровнем экспрессии NF- κ B, количеством и размером обнаруживаемых в тканях почки депозитов кальция.

Впервые методом иммуногистохимии изучены особенности экспрессии внутрипочечных ингибиторов кристаллизации (протеин Тамма-Хорсфалла, остеопонтин, бикунин) в условиях экспериментального оксалатного нефролитиаза. Показано, что развитие процессов литогенеза связано с изменением соотношения в тканях экспрессии внутрипочечных ингибиторов кристаллизации: увеличением экспрессии протеина Тамма-Хорсфалла, уменьшением экспрессии бикунина и снижением экспрессии остеопонтина.

Впервые изучены структурные проявления стресса эндоплазматического ретикулума при нефролитиазе. Доказано усиление экспрессии протеина GADD153 в тканях почки, обуславливающее активацию проапоптозной ветви стресса и снижение активности белков-шаперонов (GRP-78) эндоплазматического ретикулума на начальных этапах формирования камней. На ультраструктурном уровне выявлены изменения эндоплазматического ретикулума эпителиоцитов канальцев нефронов и собирательных трубок, свидетельствующие о мисфолдинге клеточных протеинов.

Показано, что в условиях пресыщения мочи оксалат-ионом ведущую патогенетическую роль нарушения структурно-функционального состояния почки играют процессы кристаллизации соединений кальция оксалата. Развивающиеся воспалительные изменения и нарушения редокс-баланса являются вторичными и, в свою очередь, способствуют развитию стресса эндоплазматического ретикулума в эпителиоцитах канальцев нефронов и собирательных трубок. В результате нарушения клеточного гомеостаза и субклеточных структур изменяется уровень экспрессии внутрипочечных ингибиторов кристаллизации: увеличивается экспрессия протеина Тамма-Хорсфалла, уменьшается экспрессия бикунина и остеопонтина.

Доказана патогенетическая роль оксидативного стресса на ранних этапах формирования кальциевых депозитов в тканях почки. Коррекция

перекисного окисления липидов α -токоферолом обуславливает замедление развития литогенных процессов (снижение размеров и количества формирующихся кальциевых микролитов), снижение экспрессии NF- κ B, активацию компенсаторной ветви стресса эндоплазматического ретикулума с увеличением активности белков-шаперонов (GRP-78) и нормализацию экспрессии внутрипочечных ингибиторов кристаллизации эпителиоцитами канальцев нефронов и собирательных трубок.

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены новые данные, связывающие инициацию литогенеза в условиях гипероксалурии при оксалатном нефролитиазе со структурно-функциональными изменениями элементов петли нефронов и собирательными трубками наружной и внутренней зоны мозгового вещества почки, отложением соединений кальция преимущественно в структуре эпителия с тенденцией к распространению по направлению к базальным мембранам и интерстицию. При помощи гистологического, электронномикроскопического и иммуногистохимического исследований доказано развитие стресса эндоплазматического ретикулума на ранних этапах развития оксалатного нефролитиаза. Проведенные исследования дополняют имеющиеся сведения о патогенезе развития мочекаменной болезни и могут служить базой для изучения возможностей фармакологической коррекции оксалатного нефролитиаза.

Методология и методы исследования. Методологической основой диссертационного исследования послужили работы отечественных и зарубежных авторов, посвященные вопросам морфологии и функции почки при развитии процессов кристаллизации и литогенеза. Объект исследования: почка экспериментальных животных с этиленгликолевой моделью оксалатного нефролитиаза. Предмет исследования: особенности структурной организации почки на ранних этапах развития литогенных процессов. Гипотеза исследования: в условиях пресыщения мочи оксалат-ионом и образованием нерастворимого соединения CaC_2O_4 , создаются условия для комплексного воздействия различных механизмов повреждения клеток и тканей (процессов кристаллизации, воспаления, оксидативного стресса и, возможно, стресса эндоплазматического ретикулума), опосредующих патологическую перестройку тканевых элементов почки на ранних сроках

развития литогенных процессов до формирования интерстициальных бляшек и клинически значимых крупных мочевых камней, локализованных в чашечках и лоханках. В работе использовали общие методы эмпирического исследования (наблюдение, описание, измерение, сравнение), специальные методы (гистохимия, иммуногистохимия, ультраструктурное исследование), математические методы (статистические). Статистическая обработка материала проводилась с использованием сертифицированного программного обеспечения Systat Software Inc., США.

Положения, выносимые на защиту:

1. На ранних этапах литогенеза до формирования клинически значимых крупных мочевых камней, инициация процессов кристаллизации и отложения депозитов кальция развивается преимущественно в эпителиоцитах элементов петли нефронов и собирательных трубок с активацией процессов свободно-радикального окисления и усилением экспрессии транскрипционного регулятора генов, вовлеченных в воспалительный ответ (NF- κ B). Нарушение гомеостаза клеток провоцирует развитие стресса эндоплазматического ретикулума с ранним (уже на 3 неделе эксперимента) усилением экспрессии протеина GADD153, обуславливающего активацию проапоптозной ветви стресса, и снижением активности белка-шаперона эндоплазматического ретикулума GRP-78.

2. Развитие процессов литогенеза в условиях гипероксалурии сопряжено со структурно-функциональной перестройкой элементов петли нефронов и собирательных трубок, развивающейся в области основания и средней трети почечного сосочка с последующим вовлечением в патологический процесс всех гистотопографических зон почечного сосочка и прогрессированием в области его вершины, и опосредованной отложением соединений кальция оксалата в цитоплазме и на мембранах эпителиальных клеток, расширением и фрагментацией цистерн гранулярной эндоплазматической сети, набуханием митохондрий с просветлением матрикса и деструкцией крист, формированием гигантских митохондрий с характерными ампулярно расширенными кристами и аутофагосом.

3. Прогрессированию процессов литогенеза способствует развивающееся нарушение экспрессии внутрпочечных белков-ингибиторов кристаллизации: увеличение экспрессии протеина Тамма-Хорсфалла, уменьшение экспрессии бикунина и снижение экспрессии остеопонтина.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов исследования обеспечивается достаточным для формулирования выводов объемом проведенных исследований и использованием адекватных поставленным целям и задачам валидных методов исследования. Сформулированные в диссертационной работе научные положения, выводы и практические рекомендации аргументированы и логически обоснованы результатами исследования.

Результаты работы представлены на Второй международной дистанционной научной конференции «Инновации в медицине» (Курск, 2009), на VI Международной научно-практической конференции «Окружающая среда и здоровье» (Пенза, 2009), на XII научно-практической конференции молодых ученых «Молодежь – Барнаулу» (Барнаул, 2010), на III съезде нефрологов юга России «Актуальные проблемы региональной нефрологии» (Ростов-на-Дону, 2010), на Всероссийской 70-й итоговой научной студенческой конференции им. Н.И. Пирогова (Томск, 2011), на Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 45-летию педиатрического факультета АГМУ (Барнаул, 2011), на IV Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения – 2011» (Санкт-Петербург, 2011), на III Эмбриологическом симпозиуме Всероссийского медицинского общества анатомов, гистологов, эмбриологов «Югра-Эмбрио-2011» (Ханты-Мансийск, 2011), на 4-ом Международном медицинском конгрессе студентов и молодых ученых (Кишинев, 2012), на Объединенном XII Конгрессе Международной ассоциации морфологов и VII Съезде Всероссийского медицинского общества анатомов, гистологов, эмбриологов (Тюмень, 2014), на IX Всероссийской научной конференции «Бабухинские чтения в Орле» (Орел, 2015).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 35 научных работ, в том числе 19 в ведущих рецензируемых журналах по списку ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 223 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, шести глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций. Диссертация иллюстрирована 10 таблицами, 89 рисунками. Список

используемой литературы включает в себя 521 работу, в том числе 66 источников на русском языке и 455 на иностранных.

Личный вклад автора. Заключается в выполнении лично автором анализа отечественной и зарубежной литературы по рассматриваемой проблеме; забора материала для морфологического исследования; гистологических, гистохимических, иммуногистохимических, ультраструктурных исследований; морфометрических исследований; статистической обработки и научного анализа полученных данных, их обсуждении, написании текста диссертации.

Автор выражает глубокую благодарность коллективу кафедры фармакологии ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России и в особенности д.м.н., профессору Брюханову В.М., д.м.н., профессору Звереву Я.Ф., д.б.н., профессору Лампатову В.В., д.б.н., профессору Жарикову А.Ю. за помощь в организации и проведении экспериментальной части исследования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал исследования. Содержание животных и проведение экспериментов проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества 86/609/ЕС и одобренных этическим комитетом ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России.

Для воспроизведения начальных этапов развития литогенных процессов использовали этиленгликолевую модель оксалатного нефролитиаза – одну из наиболее распространенных моделей нефролитиаза в настоящее время (Chen D.H. et al., 2004; Karadi R.V. et al., 2006; Hadjzadeh M.A. et al., 2007), которая адекватно воспроизводит нефролитиаз человека, возникающий на фоне первичной гипероксалурии (Khan S.R., 1995; Green M.L. et al., 2005). Данная модель позволяет воссоздать одно из важнейших патогенетических звеньев мочекаменной болезни: повышение в моче концентраций нерастворимых соединений, поскольку одним из метаболитов этиленгликоля в организме является оксалат-ион. В условиях сверхнасыщения мочи ионами $C_2O_4^{2-}$ происходит их активное взаимодействие с кальцием, в результате чего образуется нерастворимое соединение CaC_2O_4 , что создает условия для развития нефролитиаза (Poore R.E. et al., 1997; Baker P.R. et al., 2004).

Экспериментальная модель оксалатного нефролитиаза была выполнена на 100 сертифицированных самцах крыс линии Wistar массой тела от 180 до 250г. Объектом исследования служила почка крысы.

Все животные были разделены на пять групп по 20 крыс в каждой. Крысы первой группы находились в индивидуальных клетках на общевиварном рационе, получали в качестве питья водопроводную воду, мочекаменную болезнь у них не инициировали. Данных животных использовали в качестве контроля.

Животные второй группы на фоне стандартной лабораторной диеты в течение 21 дня получали в качестве питья 1% водный раствор этиленгликоля в свободном доступе, что индуцировало развитие оксалатного экспериментального нефролитиаза (Green M. et al., 2005).

Животные третьей группы находились в условиях стандартной лабораторной диеты в течение 42 дней и получали для питья 1% раствор этиленгликоля, что согласно литературным данным соответствовало начальным стадиям литогенеза (Жариков А.Ю. и др., 2008).

В четвертой группе животных моделировали экспериментальный нефролитиаз в течение 3 недель, последующие 3 недели на фоне продолжающегося приема этиленгликоля, животные получали внутрь через зонд α -токоферол в дозе 300 мг/кг.

Животные пятой группы после 3-недельного потребления этиленгликоля на протяжении последующих 3 недель получали натрия цитрат (субстанция Sigma Aldrich, США, каталожный номер С3674) внутрь через зонд в дозе 200 мг/кг. При этом животные продолжали потреблять этиленгликоль.

Методы исследования. Для гистологического исследования животных декапитировали путем дислокации шейного позвонка под эфирным наркозом с соблюдением требований Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или других научных целей» (Страсбург, 1986 г.), и Федерального закона Российской Федерации «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997. Материалом исследования послужила почка крысы. Орган фиксировали в 10% растворе формалина, обрабатывали по стандартной методике, заливали в парафин. Поперечные срезы через почечный сосочек толщиной 6 мкм окрашивали

гематоксилином и эозином, по MSB-методу, по ван Гизону, по Гордону-Свиту, ставили ШИК-реакцию. Оценивали ядерно-цитоплазматические отношения (ЯЦО) в эпителии собирательных трубок.

Для выявления отложений соединений кальция использовали импрегнацию серебром по методу Косса, с контролем реакции 0,1%-ным раствором соляной кислоты. Оценивали характер отложения и распределения кальциевых депозитов, их средние размеры, особенности локализации в тканях почки. Определение функциональной активности клеток эпителия собирательных трубок и фибробластов производилось при помощи окраски на аргентофильные белки ядрышкообразующих районов – AgNORs (Bio-Optica, Италия).

Иммуногистохимическое исследование проводили непрямым двухшаговым стрептавидин-биотиновым методом с контролем специфичности реакции. После стандартной процедуры депарафинизации и регидратации выполняли блокирование эндогенной пероксидазы согласно рекомендациям производителя антител (Santa Cruz, USA).

В качестве первичных антител использовали антитела к NF-κB (P-50 (Ser 337): sc-101744), 1:50; к митохондриальной супероксиддисмутазе – СОД-2 (G-20: sc-18504), 1:100; к малоновому диальдегиду – МДА (F-25: sc-130087), 1:30; к протеину Тамма-Хорсфалла – ПТХ (G-20: sc-19554), 1:80; к остеопонтину – ОПН (P-18: sc-10-593), 1:80; к бикунину – БКН (M-17: sc-21600), 1:80; к шаперону GRP78 (N-20: sc-1050), 1:50; к протеину GADD153 (F-168: sc-575), 1:100. Использовались первичные антитела фирмы Santa Cruz (USA). Продукты реакции визуализировали с помощью системы Goat ABC Staining system: sc-2023 (Santa Cruz), Rabbit ABC Staining system: sc-2018 (Santa Cruz) и диаминобензидина (ДАБ).

Для электронномикроскопического исследования образцы почки фиксировали в 4% растворе параформа, приготовленном на среде Хенкса, затем в 1% растворе OsO₄ на фосфатном буфере (pH 7,4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толуидиновым синим, изучали под световым микроскопом и выбирали необходимые участки тканей для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 50-70 нм на ультратоме Leica EM UC7, контрастировали

насыщенным водным раствором уранилацетата, цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Germany) при ускоряющем напряжении 120кВ с последующим фотографированием при увеличениях от 4000 до 80000.

Морфометрические исследования проводили с использованием программных пакетов ImageJ 1.43 (Abramoff, M.D. et al., 2004) и AxioVision 3.4LE (Carl Zeiss, Germany). Степень экспрессии (в баллах – 1+, 2+, 3+) оценивали по интенсивности окрашивания диаминобензидина (ДАБ). Для удобства интерпретации результатов рассчитывали интенсивность экспрессии по формуле: $E\% = 100 - \frac{100 \times D_x}{256}$, где E% – интенсивность экспрессии, 256 – максимум интенсивности окраски, D_x – интенсивность окрашивания ДАБ.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием статистической компьютерной программы SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., США; лицензия № 775050001). Оценку межгрупповых различий при равном числе наблюдений в группах проводили по критерию Даннетта, при неодинаковом количестве наблюдений в группах использовали критерий Данна (Гланц С., 1998). Оценка распределения качественных признаков производилась с помощью критерия хи-квадрат (χ^2). Для оценки связи описываемых признаков использовался ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Результаты работы представлены в виде значений \bar{X} (средняя арифметическая) \pm SD (стандартное отклонение). Уровень значимости достоверности различий был принят 5% ($p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение. У животных контрольной группы наблюдали нормальную гистологическую картину строения коркового и мозгового вещества почки. Размер просвета собирательных трубок составил в среднем $15,5 \pm 0,53$ мкм (таблица 1). Кальциевые депозиты у крыс интактной группы гистохимически не верифицированы. Ультраструктурных изменений в эпителиоцитах канальцев и собирательных трубок не выявлялось. Ядра клеток имели округлую форму с оформленным гетерохроматином. Расширения элементов и нарушения структуры гранулярного ЭПР не выявлялось. Определялись овальные митохондрии с правильно расположенными, четкими кристами. Количество ядрышковых организаторов на ядро в клетках эпителия составляло $1,5 \pm 0,13$,

в фибробластах интерстиция – $1,2 \pm 0,17$. Большинство ядер эпителиоцитов собирательных трубок содержали один ядрышковый организатор ($54,5 \pm 3,51\%$), количество ядер с двумя ядрышковыми организаторами составляло $32,7 \pm 1,58\%$, а тремя и более $12,8 \pm 1,49\%$.

В почках животных с экспериментальной моделью оксалатного нефролитиаза наблюдались дистрофические изменения эпителиальных клеток канальцев нефронов и собирательных трубок, воспалительные мононуклеарные инфильтраты и формирование интерстициального фиброза. Выраженность морфологической реорганизации зависела от сроков проведения эксперимента. Проведенное исследование позволило оценить в динамике гистотопографические особенности отложения соединений кальция и связанные с этим особенности гистологической перестройки тканей почки.

Таблица 1. Морфофункциональные показатели внутренней зоны мозгового вещества почки ($\bar{X} \pm SD$)

| Морфометрические показатели | Контроль | Нефролитиаз | | Нефролитиаз на фоне применения α -токоферола | Нефролитиаз на фоне применения цитрата натрия |
|-----------------------------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| | | 21 сут | 42 сут | | |
| Размер просвета собирательных трубок, мкм | $15,5 \pm 0,53$ | $19,3 \pm 0,41^*$ | $24,9 \pm 0,62^*$ | $16,4 \pm 1,56$ | $13,8 \pm 0,42$ |
| Количество AgNORs в эпителиоцитах | $1,5 \pm 0,13$ | $1,29 \pm 0,14^*$ | $1,27 \pm 0,19^*$ | $1,6 \pm 0,34$ | $1,4 \pm 0,42$ |
| Количество AgNORs в фибробластах | $1,2 \pm 0,17$ | $1,72 \pm 0,19^*$ | $1,8 \pm 0,09^*$ | $1,3 \pm 0,26$ | $1,2 \pm 0,12$ |
| Количество ядер эпителиоцитов с 1 AgNORs, % | $54,5 \pm 3,51$ | $68,2 \pm 2,42^*$ | $72,8 \pm 2,28^*$ | $52,9 \pm 3,26$ | $54,9 \pm 4,08$ |
| Количество ядер эпителиоцитов с 2 AgNORs, % | $32,7 \pm 1,58$ | $28,1 \pm 1,47^*$ | $25,9 \pm 1,21^*$ | $33,7 \pm 1,29$ | $35,2 \pm 3,41$ |
| Количество ядер эпителиоцитов с 3 и более AgNORs, % | $12,8 \pm 1,49$ | $3,7 \pm 0,69^*$ | $1,3 \pm 0,91^*$ | $13,4 \pm 1,27$ | $9,9 \pm 2,58$ |

Примечание: * – $p < 0,05$, статистическая значимость различий (по критерию Данна).

При моделировании этиленгликолевого оксалатного нефролитиаза в течение 21 суток гистологическая картина строения почки свидетельствовала о наличии местных условий для инициации литогенных процессов. В эпителиоцитах канальцев нефронов и собирательных трубок мозгового вещества в области основания и средней трети почечного сосочка наблюдались сочетанные признаки гиалиново-капельной и гидропической дистрофии, уплощение эпителиоцитов, расширение просвета собирательных трубок до $19,3 \pm 0,41$ мкм с локализацией в нем слущенных эпителиоцитов. В отдельных случаях в области вершины почечного сосочка просвет собирательных трубок был резко расширен (до 43,8 мкм), в эпителии преобладали признаки повреждения по типу гиалиново-капельной дистрофии. В переходном эпителии почечного сосочка прослеживалось уплощение, слущивание эпителия и обнажение клеток базального слоя. Определялась очаговая интерстициальная и субэпителиальная лимфогистиоцитарная инфильтрация мозгового вещества почки. Инициация литогенных процессов подтверждалась гистохимическим обнаружением в тканях почки отложений кальция, которые определялись в составе эпителия канальцев и собирательных трубок, в просветах собирательных трубок и, в меньшей степени, в интерстиции мозгового вещества. Характерной являлась локализация соединений кальция – преимущественно в области основания и средней трети почечного сосочка. В составе эпителия на вершине почечного сосочка количество микролитов было незначительным.

В поле зрения определялись умеренные количества кальциевых депозитов ($17,1 \pm 2,00$), средним размером $9,2 \pm 0,43$ мкм (таблица 2). Выявлялась инкрустация эпителия собирательных трубок соединениями кальция. В 10% наблюдений обнаруживались крупные соединения кальция (размером до 38,5 мкм) с obturацией просвета собирательных трубок.

В областях отложения кальция выявлялись разрастания соединительной ткани с формированием перитубулярного и периваскулярного фиброза, преимущественно за счет коллагеновых волокон. Наблюдалось снижение функциональной биосинтетической активности эпителиоцитов: снижалось среднее количество гранул AgNORs в ядрах клеток, нарастало количество клеток с одним AgNORs (до 68%). Отложение соединений кальция сопровождалось тканевой реакцией интерстиция с активацией фибробластов (среднее количество AgNORs в 1,4 раза превышало

показатели интактной группы), образованием соединительнотканых элементов.

Таблица 2. Интенсивность процессов кристаллизации и литогенеза во внутренней зоне мозгового вещества почки ($\bar{X} \pm SD$)

| Морфометрические показатели | Контроль | Нефролитиаз | | Нефролитиаз на фоне применения α -токоферола | Нефролитиаз на фоне применения цитрата натрия |
|---------------------------------------------|----------|-----------------|------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| | | 21 сут | 42 сут | | |
| Количество соединений кальция в поле зрения | - | 17,1 \pm 2,00 | 27,4 \pm 3,22* | 17,6 \pm 2,39 | 8,0 \pm 1,39* |
| Размер соединений кальция, мкм | - | 9,2 \pm 0,43* | 11,8 \pm 0,62* | 5,4 \pm 0,28* | 6,2 \pm 0,27* |

Примечание: * – $p < 0,05$, статистическая значимость различий (по критерию Данна).

При этом наблюдались ультраструктурные изменения эпителиоцитов канальцев нефронов и собирательных трубок, затрагивающие клеточные органеллы, ядра и клеточные мембраны. Отмечались умеренные изменения митохондрий в виде набухания, нарушения целостности внутренней мембраны, нарушения структуры крист. В отдельных эпителиоцитах обнаруживались признаки проапоптозного изменения клеток: кариопикноз и кариорексис, формирование аутолизосом. В зонах интенсивного литогенеза обнаруживались крупные вакуоли с немногочисленными, неравномерно расположенными на поверхности мембран рибосомами, что позволило идентифицировать эти элементы как расширенные цистерны гранулярного ЭПР. По всей видимости, наблюдавшиеся ультраструктурные изменения эпителиоцитов канальцевой системы почки и собирательных трубок следует рассматривать как компенсаторную реакцию, направленную на сдерживание литогенных процессов. Более выраженные изменения отмечались в апикальных полюсах эпителиоцитов, что может объясняться процессом миграции нерастворимых соединений кальция из просвета почечных канальцев в цитоплазму клеток и далее в интерстиций (Khan S.R., 1995).

Моделирование экспериментального нефролитиаза в течение 42 суток показало картину выраженных структурных изменений тканей почки с преобладанием дистрофических и некробиотических изменений эпителия канальцев нефронов и собирательных трубок. В эпителии собирательных трубок, прямых дистальных канальцев внутренней зоны мозгового вещества

почки преимущественно отмечались признаки гидропической дистрофии. Наблюдалась десквамация эпителия. Определялось расширение просвета собирательных трубок до $24,9 \pm 0,62$ мкм. В случае наличия крупных кальциевых камней просвет отдельных собирательных трубок был резко расширен (до $66,7$ мкм). Отложения кальция определялись в больших количествах, в среднем $27,4 \pm 3,22$ в поле зрения, располагались на всем протяжении почечного сосочка и реже в канальцах коркового вещества. Обнаруживаемые кальциевые депозиты были сравнительно крупными, в среднем составляя $11,8 \pm 0,62$ мкм. Характерной чертой развития литогенных процессов на данном сроке моделирования нефролитиаза являлось наличие отложений соединений кальция в просвете элементов петли (тонком и в восходящем толстом – прямом дистальном канальце) и в собирательных трубках часто с выраженной инкрустацией их эпителия. Крупные соединения кальция (размером до $57,4$ мкм), обтурирующие просвет собирательных трубок, обнаруживались в 40%. В области вершины почечного сосочка наблюдалось отложение очень мелких соединений кальция в составе эпителия канальцев нефронов и собирательных трубок и по ходу базальных мембран с миграцией в окружающий интерстиций. Мононуклеарная инфильтрация почечного интерстиция носила более выраженный характер. В областях отложения кальция определялись значительные разрастания соединительной ткани с увеличением количества коллагеновых волокон и формированием перитубулярного и периваскулярного фиброза. Под переходным эпителием почечного сосочка, интерстициально и в просвете собирательных трубок в составе белковых цилиндров определялось отложение ШИК-положительных соединений с максимальной концентрацией в области вершины и средней трети почечного сосочка. Значительно снижалась биосинтетическая активность эпителиоцитов в зонах интенсивного литогенеза, что подтверждается снижением среднего количества гранул серебра в ядрах клеток на 15% по сравнению с показателями интактных животных, продолжалось увеличение содержания клеток с одним AgNORs (до 72,8%). Биосинтетическая активность элементов интерстиция продолжала нарастать, что можно объяснить тенденцией к ограничению очага литогенеза. Наблюдавшиеся ультраструктурные изменения клеток были выражены в значительно большей степени. Определялись дистрофические и деструктивные изменения эпителиоцитов:

сглаженность базальной плазмолеммы, значительное расширение цистерн ЭПР, уменьшение числа митохондрий, их выраженный отек с просветлением матрикса, деструкция крист, кариорексис и кареолизис. Наблюдались мелкие электронноплотные депозиты кальция, фиксированные в структурах цитоплазмы и внутри митохондрий на поврежденных кристах. На фоне продолжавшейся перестройки элементов ЭПР, проапоптозных и деструктивных изменений клеток, отмечалось формирование гигантских митохондрий с характерными ампулярно расширенными кристами, на которых часто фиксировались соединения кальция.

Таким образом, на ранних сроках литогенеза отмечались ультраструктурные изменения, затрагивающие клеточные органеллы, ядра и клеточные мембраны. Выявлялись разнонаправленные изменения биосинтетической активности тканевых элементов почки: снижение биосинтетической активности эпителиоцитов канальцев в зонах интенсивного литогенеза и повышение активности клеточных элементов интерстиция, что, по всей видимости, следует рассматривать как проявление компенсаторной реакции клеток, направленной на сдерживание литогенных процессов.

Процессы кристаллизации и нуклеации, отложения соединений кальция в тканях почки, формирование мочевых камней обуславливали развитие дистрофических и некробиотических изменений тканевых структур почки, развитие воспалительных процессов с привлечением мононуклеарных клеток в зоны литогенеза. Определялась корреляционная связь (таблица 3) между интенсивностью процессов кристаллизации и литогенеза и активацией экспрессии NF- κ B.

Следует обратить внимание, что цитоплазмная экспрессия NF- κ B была слабо выражена (1+) во всех группах животных, существенно снижаясь лишь в случае моделирования нефролитиаза в течение 42 суток. При этом ядерная экспрессия NF- κ B у животных с экспериментальным нефролитиазом увеличивалась по сравнению с контрольной группой и на 3 неделе была умеренно выраженной (2+), а на 6-ой – выраженной (3+). Значительный рост экспрессии показателя отмечался в зонах интенсивного литогенеза, где превышал значения интактной группы на 17,3% и 29,9% на 21-е и 42-е сутки эксперимента соответственно.

Таблица 3. Корреляционные взаимосвязи между молекулярно-биологическими маркерами при экспериментальном оксалатном нефролитиазе (коэффициент Спирмена).

| Молекулярно-биологические маркеры | Размер Са | | СОД-2 | | МДА | | ПТХ | | ОПН | | БКН | | GRP78 | | GADD153 | | NF-kB | | Соб.тр. | | | |
|-----------------------------------|-----------|-------------------------|--------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------|-------------------------|
| | 21 сут | 42 сут | 21 сут | 42 сут | 21 сут | 42 сут | 21 сут | 42 сут | 21 сут | 42 сут | 21 сут | 42 сут | 21 сут | 42 сут | 21 сут | 42 сут | 21 сут | 42 сут | 21 сут | 42 сут | | |
| Количество Са | 0,25 | 0,41³ | -0,22 | -0,15 | -0,21 | -0,25 | 0,21 | 0,10 | 0,13 | -0,11 | 0,53² | -0,35³ | -0,12 | -0,09 | -0,40 | 0,28 | 0,61² | 0,33³ | 0,24 | -0,18 | | |
| Размер Са | | | -0,01 | -0,50³ | -0,21 | 0,33 | 0,14 | -0,37 | -0,13 | -0,09 | -0,14 | -0,30 | -0,03 | 0,17 | -0,11 | -0,22 | 0,72² | 0,39³ | 0,13 | 0,13 | | |
| СОД-2 | | | | | -0,32³ | -0,49³ | 0,30³ | 0,42² | 0,27³ | -0,23 | -0,03 | -0,11 | -0,42¹ | 0,12 | 0,35¹ | -0,16 | 0,58¹ | 0,002 | 0,10 | -0,03 | | |
| МДА | | | | | | | -0,04 | -0,32 | -0,04 | -0,45² | 0,07 | -0,06 | 0,17³ | 0,36³ | 0,03 | -0,03 | -0,36³ | -0,11 | 0,07 | -0,28 | | |
| ПТХ | | | | | | | | | -0,02 | 0,30 | -0,08 | 0,00 | -0,48¹ | 0,32 | 0,24 | -0,13 | 0,57² | -0,01 | 0,06 | 0,32 | | |
| ОПН | | | | | | | | | | | | | 0,23 | 0,38³ | 0,12 | -0,18 | 0,02 | 0,05 | 0,13 | -0,10 | -0,05 | 0,12 |
| БКН | | | | | | | | | | | | | | | 0,16 | -0,15 | -0,05 | 0,04 | -0,14 | -0,18 | 0,14 | 0,39³ |
| GRP78 | | | | | | | | | | | | | | | | | -0,51¹ | 0,09 | -0,30¹ | -0,009 | -0,09 | 0,002 |
| GADD153 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0,48¹ | 0,28³ | 0,09 | -0,15 |
| NF-kB | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0,09 | -0,15 |

Примечание: ¹ – p<0,001, ² – p<0,01, ³ – p<0,05.

Одновременно отмечалось увеличение количества экспрессирующих клеток. У контрольных животных ядерная экспрессия NF- κ B определялась лишь в 9,9% эпителиоцитов канальцев нефрона и собирательных трубок. При моделировании оксалатного нефролитиаза количество экспрессирующих клеток существенно превышали показатели здоровых животных: на 21 сутки эксперимента в 2,6 раза, на 42-е – в 2,97 раза, а в зонах интенсивного литогенеза в 3,5 и 4,7 раза на 21-е и 42-е сутки эксперимента соответственно.

Воспалительные процессы, вызываемые различными факторами, имеют в своей основе процессы реорганизации и деструкции мембран клеток и могут способствовать активации процессов свободно-радикального окисления (Вощула В.И., 2006). Конечным продуктам ПОЛ является малоновый диальдегид, служащий одним из маркеров оксидативного повреждения тканей.

Иммуногистохимическое исследование почки крыс контрольной группы показало умеренно выраженную (2+) экспрессию супероксиддисмутазы (СОД-2) в цитоплазме эпителиальных клеток канальцев нефрона и выраженную (3+) эпителием собирательных трубок. Состояние оксидантной системы характеризовалось слабо выраженной экспрессией МДА эпителиоцитами канальцев нефрона, собирательных трубок, переходным эпителием почечного сосочка (таблица 4).

Через 21 сутки моделирования экспериментального оксалатного нефролитиаза, при иммуногистохимическом исследовании тканей почек определялось статистически значимое уменьшение экспрессии СОД-2 в эпителиоцитах собирательных трубок. В эпителии собирательных трубок внутренней зоне мозгового вещества определялась слабая (1+) экспрессия СОД-2, на 5,3% уступая цифрам интактных почек. А в случае обтурации просвета собирательных трубок мочевым камнем, снижение экспрессии СОД-2 достигало максимума, и было на 7,5% ниже показателей контрольных животных. В отдельных случаях, перифокально от обтурированных собирательных трубок в эпителиоцитах отмечалось определенное усиление экспрессии СОД-2, что, вероятно, следует расценивать как компенсаторную реакцию тканей на развивающееся оксидативное повреждение.

На фоне ослабления экспрессии ферментов антиоксидантной защиты наблюдалось статистически значимое повышение содержания продуктов ПОЛ. Определялась умеренно выраженная (2+) экспрессия малонового

диальдегида в цитоплазме эпителиоцитов канальцев нефрона, собирательных трубок наружной и внутренней зоны мозгового вещества, переходном эпителии почечного сосочка. В области отложения соединений кальция отмечалось выраженное увеличение экспрессии МДА.

Таблица 4. Выраженность экспрессии маркеров оксидативного повреждения и ферментной антиоксидантной защиты (в баллах – 1+, 2+, 3+) во внутренней зоне мозгового вещества почки

| Морфометрические показатели | Контроль | Нефролитиаз | | Нефролитиаз на фоне применения α -токоферола | Нефролитиаз на фоне применения цитрата натрия |
|-----------------------------|----------|-------------|--------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| | | 21 сут | 42 сут | | |
| Супероксиддисмутаза-2 | +++ | +* | +* | +++ | +++ |
| Малоновый диальдегид | + | ++* | +++* | + | + |

Примечание: * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия от показателей интактной группы по критерию хи-квадрат (χ^2).

После 42 суток моделирования экспериментального оксалатного нефролитиаза в тканях почки определялось существенное снижение экспрессии маркеров антиоксидантной защиты. В цитоплазме эпителиоцитов собирательных трубок экспрессия СОД-2 была слабой (1+) и статистически значимо отличалась от показателей интактной группы на 5,7%. Экспрессия продуктов ПОЛ в тканях почки статистически значимо превышала показатели интактной группы. В эпителии канальцев нефрона, собирательных трубок наружной зоны мозгового вещества наблюдалась умеренно выраженная экспрессия малонового диальдегида. Выраженная экспрессия МДА эпителиоцитами собирательных трубок определялась во внутренней зоне мозгового вещества почки, ее значения статистически значимо превышали показатели интактной группы.

Выявленные ультраструктурные изменения эпителиоцитов канальцев нефронов и собирательных трубок в виде увеличения размеров и набухания митохондрий с деструкцией и лизисом крист, кариопикноз и кариорексис соответствуют современным литературным данным и отражают изменения клеток при оксидативном повреждении (Korolczuk A., 2013). Показана взаимосвязь между наличием кальция и процессами оксидативного повреждения клеток. Повышение внутриклеточного кальция приводит к активации ряда ферментов, включая стимуляцию образования АФК в

дыхательной цепи митохондрий (Гордеева А.В. и др., 2003). Имеются данные о совместном действии ионов кальция и АФК, приводящих к повышению проницаемости внутренней митохондриальной мембраны (Zoratti M., 1995). Таким образом, наблюдавшееся набухание митохондрий, повреждение их мембран, нарушение правильного расположения, дезорганизация, деструкция крист, вероятно, вероятно обусловлены внутриклеточными депозитами кальция и нарушением редокс-баланса.

В местах активного литогенеза показано уменьшение интенсивности экспрессии митохондриальной супероксиддисмутазы, что может быть обусловлено истощением ферментов системы антиоксидантной защиты или дистрофическими изменениями эпителиоцитов, снижением их общей биосинтетической активности, отложением соединений кальция в цитоплазме клеток и внутри митохондрий, ультраструктурными изменениями последних. Увеличение в этой ситуации экспрессии в тканях почек малонового диальдегида и ослабление антиоксидантной защиты в почках указывает на активацию процессов свободно-радикального окисления, что оказывает повреждающее воздействие на ткани почки, стимулируя таким образом процесс литогенеза.

Проведенное исследование показало развитие стресса эндоплазматического ретикулума при экспериментальном оксалатном нефролитиазе. Признаками развития ЭР-стресса на ультраструктурном уровне являлись наблюдавшиеся изменения эпителиоцитов канальцев нефронов и собирательных трубок: крупные вакуоли с немногочисленными, неравномерно расположенными на поверхности мембран рибосомами, что позволило идентифицировать эти элементы как расширенные цистерны гранулярной эндоплазматической сети, набухание митохондрий, нарушение целостности их внутренней мембраны, нарушение правильного расположения крист, признаки проапоптозного изменения клеток. Выявленные изменения свидетельствовали о структурно-функциональной перестройке ЭПР, мисфолдинге клеточных протеинов со срывом адаптации и развитием ЭР-стресса. При этом иммуногистохимическое исследование показало умеренно выраженную (2+) экспрессию шаперона GRP78 эпителиоцитами почечных канальцев и собирательных трубок, статистически значимо не отличающуюся от показателей интактных животных (таблица 5). В местах интенсивного литогенеза экспрессия шаперона GRP78 была

выраженной (3+), на 15,0% превышая показатели здоровых животных контрольной группы ($p < 0,05$). Выраженную экспрессию этого маркера в местах интенсивного литогенеза, вероятно, следует рассматривать как компенсаторную реакцию, направленную на сдерживание процессов развития ЭР стресса. Выраженная экспрессия GADD153 в эпителиоцитах канальцев нефронов и собирательных трубок (превышающая показатели здоровых животных на 58,3%, $p < 0,05$) свидетельствует об активации проапоптозной ветви ЭР-стресса уже на 3 неделе развития нефролитиаза. Данный факт объясняет снижение общей биосинтетической активности эпителиоцитов и нарушение экспрессии белков-ингибиторов кристаллизации.

Таблица 5. Выраженность экспрессии маркеров стресса эндоплазматического ретикулума (в баллах – 1+, 2+, 3+) во внутренней зоне мозгового вещества почки

| Морфометрические показатели | Контроль | Нефролитиаз | | Нефролитиаз на фоне применения α -токоферола | Нефролитиаз на фоне применения цитрата натрия |
|-----------------------------|----------|-------------|--------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| | | 21 сут | 42 сут | | |
| GRP-78 | ++ | ++ | +* | +++* | +++* |
| GADD153 | + | +++* | +++* | + | + |

Примечание: * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия от показателей интактной группы по критерию хи-квадрат (χ^2).

При продолжающемся воздействии этиленгликоля до 42 суток наблюдавшиеся ультраструктурные изменения клеток были выражены в значительно большей степени. На фоне продолжавшейся перестройки элементов эндоплазматической сети, проапоптозных изменений клеток, отмечалось формирование гигантских митохондрий с характерными ампулярно расширенными кристами, на которых часто фиксировались соединения кальция. Вероятно, такая структурная перестройка была обусловлена продолжающимся воздействием повреждающих агентов, усилением процессов литогенеза и дальнейшим развитием проапоптозной ветви ЭР-стресса. Это подтверждается уменьшением экспрессии (1+) маркера компенсаторной ветви развития ЭР-стресса – шаперона GRP78 эпителиоцитами канальцев нефронов и собирательных трубок (в среднем на 8,3% ниже показателей контрольной группы) и значительным (на 21,7%) снижением экспрессии шаперона в зонах интенсивного литогенеза. При этом

экспрессия GADD153 сохранялась на высоком уровне, на 49,8% превышая показатели здоровых животных ($p < 0,05$).

Таким образом, при экспериментальном оксалатном нефролитиазе показаны признаки развития стресса эндоплазматического ретикулума с ранней (уже на 3 неделе) активацией проапоптозной ветви и повреждением клеточной выстилки канальцев нефронов и собирательных трубок.

При применении цитрата натрия и хелатировании соединений кальция в первичной моче на фоне продолжающейся гипероксалурии, структурно-функциональные изменения почки были выражены в значительно меньшей степени по сравнению с группой животных с моделированием этиленгликолевого оксалатного нефролитиаза в течении 42 суток. В эпителии канальцев нефронов и собирательных трубок коркового и мозгового вещества почки отмечались умеренные признаки гиалиново-капельной дистрофии. Просвет собирательных трубок характеризовался относительной равномерностью и в среднем составлял $13,8 \pm 0,42$ мкм (таблица 1). В просвете некоторых собирательных трубок определялись единичные слущенные эпителиоциты, белковые цилиндры. Показатели биосинтетической активности тканевых элементов почки статистически значимо не отличались от показателей контрольной группы: количество ядрышковых организаторов составило $1,4 \pm 0,42$ для эпителия и $1,2 \pm 0,12$ у фибробластов; процентное соотношение эпителиоцитов собирательных трубок с одним, двумя, тремя и более ядрышковыми организаторами составляло $54,9 \pm 4,08\%$, $35,2 \pm 3,41\%$ и $9,9 \pm 2,58\%$ соответственно. В мозговом веществе почки определялось значительное снижение содержания соединений кальция (до $8,0 \pm 1,39$ в поле зрения), располагавшихся относительно равномерно по всей площади почечного сосочка, преимущественно в составе эпителия собирательных трубок и в их просвете, среди слущенных эпителиоцитов; кальциевые депозиты были мелкие, их средний размер составил $6,2 \pm 0,27$ мкм (таблица 2). Крупных соединений кальция, обтурировавших просвет канальцев и собирательных трубок, или инкрустации их эпителия не обнаруживалось. Таким образом, наблюдалось значительное замедление процесса литогенеза: по сравнению с животными с моделью нефролитиаза в течении 42 суток количество кальциевых депозитов в тканях уменьшалось в 3,4 раза (с $27,4 \pm 3,22$ до $8,0 \pm 1,39$; $p < 0,001$), а средний размер – в 1,9 раза (с $11,8 \pm 0,62$ мкм до $6,2 \pm 0,27$ мкм; $p < 0,001$).

Электронномикроскопическое исследование показало умеренную выраженность ультраструктурных изменений эпителиоцитов канальцев нефронов и собирательных трубок. Отмечалось умеренное расширение гранулярной эндоплазматической сети, слабое набухание митохондрий с просветлением матрикса и незначительной сглаженностью крист. Ядра отдельных эпителиоцитов были пикнотичны, кариорексиса не наблюдалось.

Отмечалось снижение воспалительных изменений и экспрессии NF- κ B. Лимфогистиоцитарная инфильтрация интерстиция почечного сосочка была умеренно выраженной. Интенсивность экспрессии NF- κ B в ядрах эпителиоцитов была слабо выражена (1+) и соответствовала интактным животным, количество экспрессирующих клеток составляло 14,5%. Данные факты свидетельствуют о ключевой патогенетической роли процессов кристаллизации в активации экспрессии NF- κ B.

При применении цитрата натрия экспрессия СОД-2 эпителиоцитами собирательных трубок была выраженной (3+), сопоставима с показателями интактной группы и статистически значимо (на 4,6%) превышала показатели животных с экспериментальной моделью оксалатного нефролитиаза (в течение 42 суток). На фоне хелатирования соединений кальция, снижения интенсивности процессов кристаллизации и отложения соединений кальция в тканях почки выявлялось снижение содержания продуктов ПОЛ. Отмечалась слабая экспрессия МДА в эпителиоцитах канальцев нефрона, собирательных трубок, элементах интерстиция, ее выраженность была сопоставима с таковой в интактной группе, и существенно ниже, чем у животных с экспериментальным оксалатным нефролитиазом, что указывает на необходимость кристаллизации соединений оксалата кальция для развития оксидативного стресса при экспериментальном оксалатном нефролитиазе. Отмечалось выраженное усиление экспрессии шаперона GRP78, на 10,2% превышающее показатели интактных животных ($p < 0,05$). Уровень экспрессии GADD153 (1+) в целом соответствовал показателям интактной группы.

Таким образом, применение цитрата натрия в качестве хелатирующего средства не только снижает интенсивность и выраженность процессов кристаллизации и литогенеза, но и снижает степень воспалительной реакции тканей, выраженность оксидативного повреждения, активирует синтез шаперона GRP-78, что обуславливает активацию компенсаторной ветви

стресса эндоплазматического ретикулума и опосредует снижение повреждения клеточной выстилки канальцев нефронов и собирательных трубок и их ультраструктурных изменений, что свидетельствует о ведущей патогенетической роли процессов кристаллизации при экспериментальном оксалатном нефролизе.

В условиях коррекции процессов перекисного окисления липидов применением α -токоферола отмечалось снижение структурно-функциональных изменений почек по сравнению с группами животных, в которых моделировался оксалатный нефролитиаз. В эпителиоцитах собирательных трубок коркового и мозгового вещества отмечались признаки гиалиново-капельной дистрофии. Просвет собирательных трубок характеризовался относительной равномерностью в различных полях зрения, составляя в среднем $16,4 \pm 1,56$ мкм (таблица 1). В просвете некоторых собирательных трубок располагались одиночные слущенные эпителиоциты, белковые цилиндры. Показатели биосинтетической активности тканевых элементов почки статистически значимо не отличались от показателей контрольной группы: количество ядрышковых организаторов составило $1,6 \pm 0,34$ для эпителия и $1,3 \pm 0,26$ у фибробластов; процентное соотношение эпителиоцитов собирательных трубок с одним, двумя, тремя и более ядрышковыми организаторами составляло $52,9 \pm 3,26\%$, $33,7 \pm 1,29\%$ и $13,4 \pm 1,27\%$ соответственно. Отмечалось уменьшение выраженности воспалительных изменений и экспрессии NF- κ B. Лимфогистиоцитарная инфильтрация интерстиция почечного сосочка была умеренно выраженная. Наблюдалось незначительное увеличение интерстициальной соединительной ткани. Интенсивность экспрессии NF- κ B в ядрах эпителиоцитов была умеренно выражена (2+) и соответствовала группе животных с инициацией процессов литогенеза, но количество экспрессирующих клеток снижалось до 12,5%. Согласно современным литературным данным α -токоферол обладает целым спектром разнообразных свойств. Помимо антирадикальной активности он способен непосредственно оказывать противовоспалительное действие (Okamoto N. et al., 2006), ингибировать экспрессию генов воспаления и адгезии (Azzi A. et al., 2004). Вероятно, в условиях развития экспериментального оксалатного нефролитиаза α -токоферол реализует сразу несколько механизмов. Являясь антиоксидантом, он нейтрализует АФК, что

препятствует активации NF-κB. Помимо этого, α-токоферол непосредственно деактивирует NF-κB и не дает запускать провоспалительный ответ.

В мозговом веществе почки определялось умеренное количество (до $17,6 \pm 2,39$ в поле зрения) соединений кальция, располагавшихся относительно равномерно по всей площади почечного сосочка, преимущественно в составе эпителия собирательных трубок и в их просвете, среди спущенных эпителиоцитов (таблица 2). Кальциевые депозиты были мелкие, их средний размер составил $5,4 \pm 0,28$ мкм. Крупных соединений кальция, обтурировавших просвет канальцев и собирательных трубок, или инкрустации их эпителия не обнаруживалось. Электронномикроскопическое исследование показало умеренную выраженность ультраструктурных изменений эпителиоцитов канальцевой системы почки. Отмечалось умеренное расширение гранулярной эндоплазматической сети, набухание митохондрий с увеличением их размеров, просветлением матрикса и сглаженностью крист, имели место немногочисленные лизосомы с ламеллярным содержимым. Ядра отдельных эпителиоцитов были пикнотичны, кариорексиса не отмечалось.

Иммуногистохимическое исследование почек крыс на фоне применения α-токоферола показало выраженную экспрессию СОД-2 эпителиоцитами собирательных трубок, сопоставимую с показателями интактной группы. Во внутренней зоне мозгового вещества этот показатель оказался даже несколько выше, на 2,2% превышая показатели интактных почек. При использовании антиоксиданта (α-токоферола) выраженность экспрессии СОД-2 во всех отделах мозгового вещества статистически значимо (на 12,5%) превышала показатели животных с экспериментальной моделью оксалатного нефролитиаза в течение 42 суток. Наблюдалась отрицательная слабая корреляционная связь между экспрессией СОД-2 и молекулярно-биологическими маркерами интенсивности процессов кристаллизации (количество кальциевых депозитов $r = -0,40$, $p < 0,05$, размер кальциевых депозитов $r = -0,30$, $p < 0,05$). На фоне блокирования процессов оксидативного повреждения α-токоферолом выявлялось снижение содержания продуктов ПОЛ. Отмечалась слабая экспрессия МДА в эпителиоцитах канальцев нефронов, собирательных трубок, переходного эпителия почечного сосочка, элементах интерстиция, ее выраженность была

сопоставима с таковой в интактной группе, и существенно ниже, чем у животных с экспериментальным оксалатным нефролитиазом. На этом фоне отмечалось значительное замедление процессов литогенеза. Наблюдалось выраженное снижение количества кальциевых депозитов в поле зрения, их средний размер на фоне применения антиоксидантов уменьшался более чем в 2 раза (максимальные значения в 4,4 раза) по сравнению с животными с соответствующими сроками моделирования нефролитиаза.

Нормализация показателей биосинтетической активности клеточных элементов почки вероятно обусловлены тем, что в условиях коррекции ПОЛ применением α -токоферола отмечалось выраженное усиление экспрессии шаперона GRP78, что указывает на обусловленность процессов ЭР-стресса нарушением редокс-баланса при экспериментальном оксалатном нефролитиазе. Уровень экспрессии GADD153 (1+) в целом соответствовал показателям интактной группы. При этом отмечена меньшая степень выраженности структурной перестройки почек, изменения ультраструктуры эпителия по сравнению с животными с нефролитиазом и замедление процесса литогенеза, что вероятно обусловлено активацией компенсаторной реакции клеток в ходе коррегирующей терапии.

Таким образом, применение антиоксиданта оказывает благоприятное воздействие на морфоструктурную перестройку почек у животных с экспериментальным оксалатным нефролитиазом, уменьшает выраженность воспалительной реакции, снижает степень оксидативного повреждения клеток и тканей и способствует уменьшению количества и размеров образовавшихся депозитов кальция. Показан эффект α -токоферола на развитие ЭР-стресса с активацией компенсаторной реакции клеток и угнетением проапоптозной ветви, что выражается в снижении повреждения клеточной выстилки канальцев нефронов и собирательных трубок и их ультраструктурных изменений.

Развитие процессов кристаллизации и литогенеза, воспаления, оксидативного стресса и ЭР-стресса обуславливало нарушение гомеостаза и изменение биосинтетической активности эпителиоцитов канальцев нефронов и собирательных трубок. В результате наблюдалось нарушение экспрессии внутрипочечных ингибиторов кристаллизации: протеина Тамма-Хорсфалла (ПТХ), остеопонтинина (ОПН) и бикунина (БКН) (таблица 6).

Экспрессия ПТХ у здоровых крыс и при экспериментальном нефролитиазе фиксировалась преимущественно на апикальной мембране эпителия дистальных канальцев и собирательных трубок. Это согласуется с литературными данными, согласно которым, ПТХ главным образом, локализуется в толстом восходящем отделе петли Генле (Зверев Я.Ф. и др., 2010). Было установлено, что после 21 суток употребления экспериментальными животными этиленгликоля экспрессия ПТХ усиливалась почти на 10%. Присутствие ПТХ отмечалось не только в цитоплазме и на апикальной мембране эпителиоцитов, но и в интерстиции, то есть в местах локализации депозитов кальция. Продолжающееся моделирование нефролитиаза до 42 суток вызывало снижение экспрессии ПТХ, статистически значимо превышающей показатели контрольных животных на 4,6%. Зафиксированный рост экспрессии ПТХ вероятно можно рассматривать как адаптивный механизм, направленный на защиту почек от токсического действия оксалат-ионов и их кальциевых солей. Также нельзя исключить, что повышенное содержание ПТХ в структурах почки при инициации литогенных процессов, может быть обусловлено нарушением биосинтеза и образованием крупномолекулярных комплексов ПТХ. Такие комплексы способны выступать в качестве промоутеров процессов кристаллизации и рассматриваются как маркеры ранних стадий литогенеза (Аль-Шукри С.Х. и др., 2011). Последующая тенденция к снижению экспрессии ПТХ соответствует литературным данным, рассматривающих факт снижения экспрессии внутрипочечных ингибиторов кристаллизации как причину формирования мочевых камней (Зверев Я.Ф. и др., 2010).

Анализ почечной экспрессии бикунина при экспериментальном нефролитиазе показал его преимущественно цитоплазменную локализацию в эпителиоцитах элементов петли нефронов и собирательных трубок. В группе животных с моделированием нефролитиаза в течение 21 суток отмечалась слабая (1+) экспрессия БКН, статистически значимо меньше показателей контрольных животных на 5,5%. При продолжающемся воздействии этиленгликоля до 42 суток интенсивность экспрессии БКН сохранялась на низком уровне, статистически значимо не отличаясь от группы животных с инициацией процессов кристаллизации.

Таблица 6. Выраженность экспрессии внутрипочечных ингибиторов кристаллизации (в баллах – 1+, 2+, 3+) во внутренней зоне мозгового вещества почки

| Морфометрические показатели | Контроль | Нефролитиаз | | Нефролитиаз на фоне применения α -токоферола | Нефролитиаз на фоне применения цитрата натрия |
|-----------------------------|----------|-------------|--------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| | | 21 сут | 42 сут | | |
| Протеин Гамма-Хорсфалла | ++ | +++* | +++* | ++ | ++ |
| Бикунин | ++ | +* | +* | ++ | ++ |
| Остеопонтин | ++ | +* | +* | ++ | ++ |

Примечание: * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия от показателей интактной группы по критерию хи-квадрат (χ^2).

У животных контрольной группы определялась умеренно выраженная (2+) экспрессия ОПН в цитоплазме эпителия канальцев нефронов и собирательных трубок. При моделировании нефролитиаза отмечалась слабая экспрессия той же локализации статистически значимо меньше на 5,9% и 4,2% на 21-е и 42-е сутки эксперимента соответственно. Факт снижения экспрессии ОПН является значимым в развитии литогенных процессов, в клинических исследованиях показано значительное снижение содержания ОПН в моче пациентов, страдающих нефролитиазом (Yasui T. et al., 1999; Tsuji H. et al., 2007).

Снижение интенсивности процессов кристаллизации хелатированием ионов кальция и обусловленные этим уменьшение выраженности оксидативного повреждения и воспалительных процессов способствовало нормализации экспрессии ингибиторов кристаллизации. В этих условиях интенсивность и локализация экспрессии ПТХ соответствовали контрольной группе животных. Отмечалась умеренно выраженная (2+) экспрессия ПТХ в цитоплазме и на апикальных мембранах клеток прямых дистальных канальцев и собирательных трубок наружной зоны мозгового вещества без признаков интерстициальной локализации. Экспрессия БКН и ОПН была умеренно выраженной (2+) и статистически значимо не отличалась от показателей контрольной группы животных. Нормализация показателей биосинтетической активности клеточных элементов почки и экспрессии ингибиторов кристаллизации, также могут быть обусловлены активацией компенсаторной ветви ЭР-стресса.

В условиях коррекции ПОЛ применением α -токоферола наблюдалась

нормализация экспрессии ингибиторов кристаллизации. Интенсивность и локализация экспрессия ПТХ соответствовала контрольной группе животных. Отмечалась умеренно выраженная (2+) экспрессия протеина в цитоплазме и на апикальных мембранах клеток эпителия толстого восходящего отдела петли Генле и собирательных трубок наружной зоны мозгового вещества без признаков интерстициальной локализации. Экспрессия БКН и ОПН была умеренно выраженной (2+) и статистически значимо не отличалась от показателей контрольной группы животных. Коррекция ПОЛ вероятно определяло уменьшение повреждения белковых макромолекул АФК, что в совокупности с уменьшением выраженности процессов ЭР-стресса обуславливало нормализацию экспрессии ингибиторов кристаллизации.

Таким образом, при развитии экспериментального оксалатного нефролитиаза и воздействии на эпителиоциты канальцев нефронов и собирательных трубок неспецифических факторов нарушения структурно-функционального гомеостаза (кристаллизации и литогенеза, воспаления, оксидативного стресса и ЭР-стресса) показано увеличение экспрессии протеина Тамма-Хорсфалла, уменьшение экспрессии бикунина и снижение экспрессии остеопонтина в тканях почки, что может способствовать развитию процессов камнеобразования. Выявленные закономерности можно рассматривать в качестве характерных признаков развития экспериментального оксалатного нефролитиаза.

ВЫВОДЫ

1. В условиях гипероксалурии развитие процессов литогенеза связано с отложением нерастворимых соединений кальция в эпителиальных клетках элементов петли нефронов и собирательных трубок, с тенденцией к распространению депозитов кальция через базальную мембрану в почечный интерстиций. Кристаллизация соединений кальция и миграция депозитов ассоциирована с ультраструктурной перестройкой эпителия канальцев нефронов и собирательных трубок: фиксацией соединений кальция в цитоплазме и на мембранных структурах клеток, расширением и фрагментацией цистерн гранулярной эндоплазматической сети, отеком митохондрий с просветлением матрикса и деструкцией крист,

формированием гигантских митохондрий с характерными ампулярно расширенными кристами, аутофагосом, что опосредует структурно-функциональные изменения клеток и снижение их биосинтетической активности.

2. Отложение нерастворимых тканевых депозитов кальция при экспериментальном оксалатном нефролитиазе инициируется преимущественно в области основания и средней трети почечного сосочка с дальнейшим распространением и прогрессированием в области его вершины, что указывает на последовательность развития литогенных процессов в связи с развивающимися структурно-функциональными изменениями эпителия элементов петли нефронов и собирательных трубок различных гистотопографических зон мозгового вещества почки в условиях гипероксалурии.

3. При экспериментальном оксалатном нефролитиазе в гистотопографических зонах развития литогенных процессов в тканях почки обнаруживается накопление малонового диальдегида и недостаточность системы ферментной антиоксидантной защиты в связи со снижением экспрессии митохондриальной супероксиддисмутазы. Это указывает на патогенетическую связь процессов кристаллизации с формированием тканевых депозитов кальция и развития оксидативного стресса.

4. На ранних этапах камнеобразования при экспериментальном оксалатном нефролитиазе развитие процессов кристаллизации и инициация литогенеза в тканях почки опосредуют активацию экспрессии ключевого транскрипционного фактора воспалительного ответа – ядерного фактора- κ B (NF- κ B).

5. При экспериментальном оксалатном нефролитиазе продемонстрированы структурно-функциональные признаки развития стресса эндоплазматического ретикулума с ранним (уже на 3 неделе) усилением экспрессии белка GADD153, что является маркером активации проапоптозной ветви стресса, опосредующей повреждение эпителия канальцев нефронов и собирательных трубок.

6. Развитие литогенных процессов при экспериментальном оксалатном нефролитиазе тесно связано с изменением соотношения в тканях экспрессии внутрипочечных ингибиторов кристаллизации: увеличением экспрессии протеина Тамма-Хорсфалла, уменьшением экспрессии бикунина и

снижением экспрессии остеопонтина, что имеет патогенетическое значение для прогрессирования процессов камнеобразования.

7. Коррекция перекисного окисления липидов применением α -токоферола уменьшает структурные признаки повреждения эпителиоцитов канальцев нефронов и собирательных трубок путем снижения деструктивных проявлений оксидативного стресса, а также коррекции развития стресса эндоплазматического ретикулума посредством активации синтеза шаперона GRP-78 и ослабления уровня экспрессии белка GADD153. Это способствует нормализации экспрессии внутрипочечных ингибиторов кристаллизации и свидетельствует о патогенетически важной роли оксидативного стресса на ранних этапах течения литогенных процессов.

8. Снижение интенсивности процессов литогенеза хелатированием кальция мочи цитратом натрия обуславливает нормализацию уровня экспрессии NF- κ B, митохондриальной супероксиддисмутазы и малонового диальдегида эпителием канальцев нефронов и собирательных трубок, что свидетельствует об иницирующей патогенетической роли процессов кристаллизации в развитии оксидативного стресса и активации экспрессии NF- κ B на ранних этапах развития литогенных процессов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Талалаев, С.В. Обратимость структурных изменений мозгового вещества почки крыс, вызванных субхроническим приемом этиленгликоля / С.В. Талалаев, А.В. Лепилов, В.П. Булгаков, Я.Ф. Зверев, В.В. Лампатов, Н.В. Лель, Ю.Г. Мотин // **Нефрология.** – 2008. – № 1. – С.53-57.

2. Брюханов, В.М. Функция почек в условиях экспериментального оксалатного нефролитиаза / В.М. Брюханов, Я.Ф. Зверев, В.В. Лампатов, А.Ю. Жариков, О.В. Азарова, Ю.Г. Мотин // **Нефрология.** – 2008. – №1. – С.69-74.

3. Мотина, Н.В. Влияние длительного применения препарата Маакии амурской на течение экспериментального нефролитиаза / Н.В. Мотина, А.В. Лепилов, С.В. Талалаев, Ю.Г. Мотин // **Материалы Второй международной дистанционной научной конференции «Инновации в медицине» / КГМУ,**

Центрально-Черноземный научный центр РАМН, Общероссийская общественная организация «Российский Союз молодых ученых» / Под ред. проф. В.А. Лазаренко, проф. П.В. Калущкого. – Курск, 2009. – С.127-129.

4. Мотина, Н.В. Морфологическая характеристика третьей недели оксалатного нефролитиаза / Н.В. Мотина, А.В. Лепилов, С.В. Талалаев, С.А. Полежаева, Ю.Г. Мотин // **Вестник Российского университета дружбы народов. Сер.: Медицина.** – 2009. – № 4. – С.639-640.

5. Мотина, Н.В. Морфологические изменения в почках крыс при экспериментальном нефролитиазе на фоне длительного применения клеточной культуры Маакии амурской / Н.В. Мотина, В.М. Брюханов, О.В. Азарова, А.Ю. Жариков, С.В. Талалаев, В.П. Булгаков, С.А. Федореев, Н.П. Мищенко, Ю.Г. Мотин // **Нефрология.** – 2009. – № 4. – С.75-79.

6. Мотина, Н.В. Морфологическая характеристика этиленгликолевого нефролитиаза / Н.В. Мотина, С.В. Талалаев, А.В. Лепилов, С.А. Полежаева, Ю.Г. Мотин // VI Международная научно-практическая конференция «Окружающая среда и здоровье». – Пенза, 2009. – С.87-90.

7. Мотина, Н.В. Последовательность структурной перестройки почки в ходе моделирования экспериментального нефролитиаза / Н.В. Мотина, Ю.Г. Мотин // Научный вестник Ханты-Мансийской государственной медицинской академии. – 2010. – № 1-2. – С.36-37.

8. Мотина, Н.В. Морфологические и биохимические признаки оксидативного повреждения в условиях развития экспериментального нефролитиаза / Н.В. Мотина, А.Ю. Жариков, О.С. Талалаева, Ю.Г. Мотин // Материалы III съезда нефрологов юга России «Актуальные проблемы региональной нефрологии». – Ростов-на-Дону, 2010. – С.111-113.

9. Жариков, А.Ю. Роль антиоксидантной терапии в фармакологической коррекции экспериментального нефролитиаза / А.Ю. Жариков, О.С. Талалаева, Я.Ф. Зверев, В.В. Лампатов, О.В. Азарова, А.В. Кудинов, Ю.Г. Мотин // **Нефрология.** – 2010. – №4. – С.53-58.

10. Мотина, Н.В. Структурная перестройка почки на ранних сроках экспериментального нефролитиаза / Н.В. Мотина, А.В. Лепилов, А.Ю. Жариков, Ю.Г. Мотин // **Вестник Российского университета дружбы народов. Сер.: Медицина.** – 2010. – № 4. – С.360-361.

11. Мотин, Ю.Г. Оксидативный стресс как один из факторов повреждения на ранних сроках экспериментального нефролитиаза / Ю.Г.

Мотин, А.Ю. Жариков, В.М. Брюханов, Я.Ф. Зверев, А.В. Лепилов, В.В. Лампатов, Н.В. Мотина // *Морфология*. – 2011. – № 1. – С.33-37.

12. Мотин, Ю.Г. Экспрессия супероксиддисмутазы в почке при экспериментальном нефролитиазе / Ю.Г. Мотин // Всероссийская 70-я итоговая научная студенческая конференция им. Н.И. Пирогова (Томск, 16-18 мая 2011 г.): сборник статей / под ред. В. В. Новицкого, Л. М. Огородовой. – Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2011. – С.294-296.

13. Мотина, Н.В. Роль оксидативного повреждения в развитии оксалатного нефролитиаза у крыс / Н.В. Мотина, А.Ю. Жариков, Я.Ф. Зверев, А.В. Лепилов, В.В. Лампатов, Ю.Г. Мотин // **Якутский медицинский журнал**. – 2011. – № 2. – С.50-53.

14. Мотина, Н.В. Благоприятное воздействие антиоксидантной терапии на структурную перестройку почки в условиях экспериментального оксалатного нефролитиаза / Н.В. Мотина, В.М. Брюханов, Я.Ф. Зверев, С.В. Талалаев, В.В. Лампатов, А.Ю. Жариков, Ю.Г. Мотин // **Нефрология**. – 2011. – №2. – С.57-61.

15. Жариков, А.Ю. Влияние α -токоферола ацетата на экспрессию внутрипочечных ингибиторов кристаллизации при экспериментальном нефролитиазе / А.Ю. Жариков, Ю.Г. Мотин, Я.Ф. Зверев, В.М. Брюханов, В.В. Лампатов // **Медицина в Кузбассе**. – 2011. – №3. – С.27-31.

16. Жариков, А.Ю. Влияние натрия фитата на течение экспериментального оксалатного нефролитиаза / А.Ю. Жариков, Я.Ф. Зверев, В.В. Лампатов, В.М. Брюханов, А.В. Кудинов, Ю.Г. Мотин // **Сибирский медицинский журнал (Иркутск)**. – 2011. – №5. – С.30-33.

17. Жариков, А.Ю. Благоприятное влияние натрия цитрата и натрия фитата на оксидативное повреждение почек при экспериментальном нефролитиазе / А.Ю. Жариков, Ю.Г. Мотин, Я.Ф. Зверев, С.В. Замятина // **Вестник уральской медицинской академической науки**. – 2011. – №3/1 (37). – С.26.

18. Мотин, Ю.Г. Цитопротективное действие α -токоферола при экспериментальном нефролитиазе. / Ю.Г. Мотин, Н.В. Мотина, Я.Ф. Зверев, А.В. Лепилов // **Вестник уральской медицинской академической науки**. – 2011. – №3/1 (37). – С.39.

19. Мотина, Н.В. Влияние α -токоферола на течение экспериментального нефролитиаза / Н.В. Мотина, С.В. Талалаев, А.Ю. Жариков, Ю.Г. Мотин // Актуальные вопросы профилактической медицины. – Барнаул, АЗБУКА. – 2011. – С.192-193.

20. Мотина, Н.В. Изменение функциональной активности клеток почечных канальцев при нефролитиазе / Н.В. Мотина, А.Ю. Жариков, С.В. Талалаев, Ю.Г. Мотин // Педиатрия Алтая на рубеже тысячелетия: материалы научно-практической Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 45-летию педиатрического факультета АГМУ. – Барнаул: Изд-во ГОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет», 2011. – С.180-182.

21. Жариков, А.Ю. Особенности экспрессии протеина Тамма-Хорсфалла при экспериментальном нефролитиазе / А.Ю. Жариков, Ю.Г. Мотин, Я.Ф. Зверев, В.В. Лампатов // Морфология. – 2011. – №5. – С.86.

22. Мотин, Ю.Г. Повреждение тканей почки продуктами свободно-радикального окисления при экспериментальном нефролитиазе / Ю.Г. Мотин, Я.Ф. Зверев, А.В. Лепилов, Н.В. Мотина // Морфология. – 2011. – №5. – С.101-102.

23. Мотина, Н.В. Перестройка внутренней зоны мозгового вещества почки в ранние сроки экспериментального нефролитиаза / Н.В. Мотина, А.Ю. Жариков, С.В. Талалаев, Ю.Г. Мотин // Морфология. – 2011. – №5. – С.102.

24. Bryukhanov, V.M. Influence of oxidative damage on lithogenesis in experimental nephrolithiasis / V.M. Bryukhanov, Yu.G. Motin, A.Yu. Zharikov, Ja.F. Zverev, V.V. Lampatov, N.V. Motina // International journal of biomedicine. – 2011. – V.1(4). – P.228-230.

25. Жариков, А.Ю. Особенности экспрессии внутрипочечных ингибиторов кристаллизации при экспериментальном нефролитиазе / А.Ю. Жариков, Ю.Г. Мотин, Я.Ф. Зверев, В.В. Лампатов, В.М. Брюханов, О.С. Талалаева // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2012. – №2. – С.249-252.

26. Motin, Y. Relationship of lithogenesis and oxidative damage in experimental nephrolithiasis / Y. Motin, A. Zharikov // MedEspera : 4th Intern. Medical Congr. for Students and Young Doctors, May 17-19, 2012, Chisinau, Rep.

of Moldova : Abstract Book. – Ch.: S. n., 2012 (Tipogr.-Sirius). – P.136-137.

27. Мотин, Ю.Г. Изменение биосинтетической активности тканевых элементов почки и экспрессии модуляторов кристаллизации при экспериментальном оксалатном нефролитиазе / Ю.Г. Мотин, А.В. Лепилов, А.Ю. Жариков, А.Н. Корнаухов // **Морфологические ведомости.** – 2013. – №2. – С.105-108.

28. Мотин, Ю.Г. Активация стресса эндоплазматической сети при экспериментальном нефролитиазе / Ю.Г. Мотин, А.В. Лепилов, С.В. Талалаев, Н.В. Мотина // **Морфология.** – 2014. – №3. – С.133.

29. Мотина, Н.В. Влияние антиоксидантной терапии на развитие стресса эндоплазматической сети при экспериментальном нефролитиазе / Н.В. Мотина, А.В. Лепилов, А.Ю. Жариков, Ю.Г. Мотин // **Морфология.** – 2014. – №3. – С.133-134.

30. Мотин, Ю.Г. Ранние морфологические и ультраструктурные изменения почки при экспериментальном оксалатном нефролитиазе / Ю.Г. Мотин, Н.В. Бгатова, А.В. Лепилов, В.В. Лампатов, А.Ю. Жариков, Н.В. Мотина // **Медицина в Кузбассе.** – 2015. – №2. – С.43-47.

31. Мотин, Ю.Г. Гистологическое обоснование применения антиоксидантов при экспериментальном нефролитиазе / Ю.Г. Мотин, А.В. Лепилов, А.Ю. Жариков, Н.В. Мотина, Н.Г. Крючкова // **Морфология.** – 2015. – №3. – С.77.

32. Мотин, Ю.Г. Морфологическое исследование почек крыс при экспериментальном оксалатном нефролитиазе / Ю.Г. Мотин, Г.А. Лапий, А.В. Лепилов, Н.П. Бгатова, А.Ю. Жариков, Н.В. Мотина, Л.М. Непомнящих // **Фундаментальные исследования.** – 2015. – №1, часть 8. – С.1639-1644.

33. Мотин, Ю.Г. Влияние антиоксидантной терапии на ультраструктурные изменения клеточных элементов почки при экспериментальном нефролитиазе / Ю.Г. Мотин, Н.П. Бгатова, А.В. Лепилов, А.Ю. Жариков, Н.В. Мотина, Н.Г. Крючкова // **Морфологические ведомости.** – 2015. – №1. – С.61-67.

34. Мотин, Ю.Г. Развитие стресса эндоплазматического ретикулума при экспериментальном оксалатном нефролитиазе / Ю.Г. Мотин, А.В. Лепилов, Н.П. Бгатова, А.Ю. Жариков, Н.В. Мотина, Г.А. Лапий, Е.Л. Лушникова, Л.М. Непомнящих // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2015. – №9. – С.369-373.

35. Мотин, Ю.Г. Морфологические изменения почки при экспериментальном оксалатном нефролитиазе / Ю.Г. Мотин, А.В. Лепилов, П.М. Ларионов // **Архив патологии.** – 2017. – №2(79). – С.41-47.