

© А.Ю.Жариков, Я.Ф.Зверев, В.М.Брюханов, В.В.Лампатов, 2009
УДК 616.61-003.7-02:616.633.461.2

А.Ю. Жариков¹, Я.Ф. Зверев¹, В.М. Брюханов¹, В.В. Лампатов¹

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МОДУЛЯТОРАХ ОКСАЛАТНОГО НЕФРОЛИТИАЗА. I. СТИМУЛЯТОРЫ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ

A.Yu. Jaricov, Ya.F. Zverev, V.M. Brukhanov, V.V. Lampatov

THE CURRENT CONCEPTIONS ABOUT THE MODULATORS OF THE OXALATE NEPHROLYTHIASIS. I. STIMULATORS OF CRYSTALLIZATION

¹ Кафедра фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г.Барнаул, Россия

РЕФЕРАТ

В обзоре проанализированы факторы, способствующие кристаллизации оксалата кальция в почечных канальцах, и их роль в патогенезе мочекаменной болезни. Обсуждены общие представления о взаимодействии кристаллов с клетками эпителия канальцев почек. В качестве кандидатных кристалл-связывающих молекул рассмотрены сиаловая кислота, остеопонтин, фосфатидилсерин, белок, связанный с нуклеолином, аннексин II и гиалуронан, который, по-видимому, является основным индуктором кристаллизации. Поддержано мнение, согласно которому инициирующим моментом кристаллизации является обусловленное различными причинами повреждение почечного эпителия.

Ключевые слова: оксалатный нефролитиаз, стимуляторы кристаллизации.

ABSTRACT

In this review were analyzed the factors, helping in crystallization of calcium oxalate in renal tubules, and their role in pathogenesis of urinary kidney disease. The basic statements on the about the interactions of crystals with the epithelial renal tubular cells. For the role for the possible candidates for crystal connecting molecules were viewed sialic acid, osteopontin, phosphatidiserin, protein, connected with nucleolin, annexin II and hyaluronan, which, probably, is the main inductor of crystallization. Was supported the opinion, according to which the initiating moment of crystallization is renal epithelial damage of various genesis.

Key words: oxalate nephrolythiasis, stimulators of crystallization.

На протяжении всей жизни в организме человека, и в том числе в почках, в условиях постоянно образующейся пересыщенной многими солями мочи идет процесс синтеза нерастворимых микрокристаллов. Этот перманентный процесс является весьма безобидным, поскольку у большинства людей кристаллы легко покидают почку с током мочи. Согласно известным экспериментальным данным, полученным D.G.Kok [1], скорость движения жидкости вдоль различных отделов нефрона составляет от 24 сек в проксимальных почечных канальцах до 48 сек в собирательных трубках (общее время пребывания мочи в нефроне – 254 сек), что вполне способно обеспечить экскрецию кристаллов без появления признаков нефролитиаза. Однако при определенных условиях образующиеся микрокристаллы могут прикрепляться к стенкам почечных канальцев, создавать увеличивающиеся в размерах агрегаты, что ведет к развитию нефрокальциноза, нефролитиаза и, в конце

концов, обуславливает развитие мочекаменной болезни (МКБ). Суть проблемы состоит в идентификации этих «определенных условий», что в значительной степени и является ключевым фактором, определяющим наше понимание основных звеньев патогенеза заболевания. Согласно современным представлениям, в коллоидном растворе, которым является моча, во время движения вдоль почечных канальцев, как и ряде других тканей, сосуществуют два процесса, определяющих интенсивность биоминерализации: стимуляция и ингибирование кристаллизации. Как правило, эти процессы находятся в динамическом равновесии. Сдвиг же этого равновесия в сторону активации образования кристаллов, наряду с другими факторами, в конечном счете и приводит к возникновению мочекаменной болезни.

Сегодня на страницах специальной литературы развернулась весьма оживленная дискуссия по поводу пускового механизма, ответственного за инициирование оксалатного нефролитиаза. Исследователи под руководством S.R.Khan после длительного изучения так называемых «стрессовых

Зверев Я.Ф. Алтайский медицинский университет, кафедра фармакологии. 656038, г.Барнаул, пр.Ленина, 40, (3852) 26-08-35, zver@asmu.ru

факторов», выдвинули предположение о том, что одним из главных факторов риска при МКБ, наряду с воспалением и ишемией, является оксалат в связи с его местной токсичностью и плохой растворимостью [2-5]. Одновременно высказанная идея нашла подтверждение и в работах других авторов [6-10]. Это привело к созданию гипотезы, согласно которой оксалат инициирует в почке оксидативный стресс, генерируя здесь продукты свободно-радикального окисления [11-15]. Пока, к сожалению, не ясно, являются ли образующиеся свободные радикалы причиной повреждения почечной ткани или они образуются в результате повреждения канальцевого эпителия [16]. Более того, в процессе дискуссии высказываются сомнения в повреждающей роли оксалата, поскольку в ряде работ этот эффект наблюдался лишь при его использовании в концентрациях значительно превышающих физиологические, а повреждение индуцировалось не в тех отделах нефрона, где происходит отложение кристаллов [17-20].

Как бы то ни было, сегодня господствует мнение, согласно которому интактный почечный эпителий не является благоприятной основой для прикрепления кристаллов. Но когда по тем или иным причинам (чаще под влиянием оксалата) возникает повреждение клеток канальцев с последующей активацией процессов регенерации и репарации, возникают условия для их селективного связывания с кристаллами [21]. По мнению нидерландских исследователей из лаборатории С.Ф. Verkoelen, пролиферирующие и мигрирующие клетки уротелия, в отличие от интактных, экспрессируют на своей поверхности молекулы соединений, обладающих высоким аффинитетом к кристаллам [21-24]. Эти вещества, представляющие собой специфические макромолекулы, участвуют в регуляции взаимоотношений кристалл – клетка, выполняя роль стимуляторов (промоуторов) адгезии кристаллов. Такие соединения получили название «кристалл-связывающие молекулы» (СВМ). В настоящем обзоре мы сфокусируем внимание на подробном описании функциональных свойств этих стимуляторов прикрепления кристаллов к поверхности клеток почечного эпителия.

Общие представления о взаимодействиях кристалл – клетка

В 1978 году В. Finlayson и F. Reid [25] предложили теорию «фиксированной частицы» («fixed-particle»), в противовес теории «свободной частицы» («free-particle»), выдвинутой десятью годами ранее [26]. Смысл последней состоял в том, что в процессе прохождения нерастворимой частицы вдоль нефрона она быстро и значительно увеличивается в размерах, достигая величины, способной

обтурировать собирательные трубки. Согласно теории «фиксированной частицы» высокая скорость продвижения по канальцам не позволяет частице за считанные минуты достичь таких размеров. Поэтому в основе предстоящей кристаллизации лежит фиксация мелкой частицы на поверхности клеток почечных канальцев с последующим ее ростом. Отсюда возникает основной вопрос: что заставляет микрокристаллы прикрепляться к апикальной мембране канальцевых клеток? Авторы теории «фиксированной частицы» говорят о появлении на поверхности почечных канальцев некоей «... сплошной новой зоны ...», необходимой для фиксирования микрочастиц [25]. Цитируемая работа положила начало большому числу исследований, благодаря которым значительно продвинулось наше понимание событий, предшествующих образованию почечных конкрементов. Сегодня процесс взаимодействия кристалл – клетка рассматривается как ключевой момент в патогенезе нефролитиаза. А интенсивное изучение этой проблемы предопределило идентификацию целого ряда кристалл-связывающих молекул (СВМ).

Молекулярные механизмы, обеспечивающие взаимодействие кристаллов с молекулами апикальной поверхности почечного эпителия, до сих пор исследованы недостаточно. И все же, в последние годы благодаря применению таких современных методов как молекулярное моделирование и атомно-силовая микроскопия (atomic-force microscopy, AFM) позволили несколько приоткрыть завесу над этим во многом таинственным процессом. Определение с помощью этих методов стереохимических аспектов взаимоотношений между кристаллами и клетками уротелия позволило установить ряд факторов, обеспечивающих модулирование процесса кристаллизации [27-30]. AFM является инструментом, который позволяет в режиме реального времени исследовать рост кристаллов в растворе с фиксацией взаимодействия отдельных молекул с гранями кристалла. При этом в ходе эксперимента появляется возможность четко контролировать состав, температуру, pH и скорость тока используемого раствора, что, в свою очередь, позволяет исследовать эффекты модуляторов изучаемого процесса [31]. Недавно с помощью AFM удалось измерить силу взаимодействия между кристаллами СОМ коллоидных проб и монослоями клеток почечного эпителия и показать, что эта сила обусловлена ионными или водородными связями испытываемых образцов [32, 33].

Как известно, практически все кристаллы в почках представлены нерастворимыми солями кальция, причем большая их часть приходится на

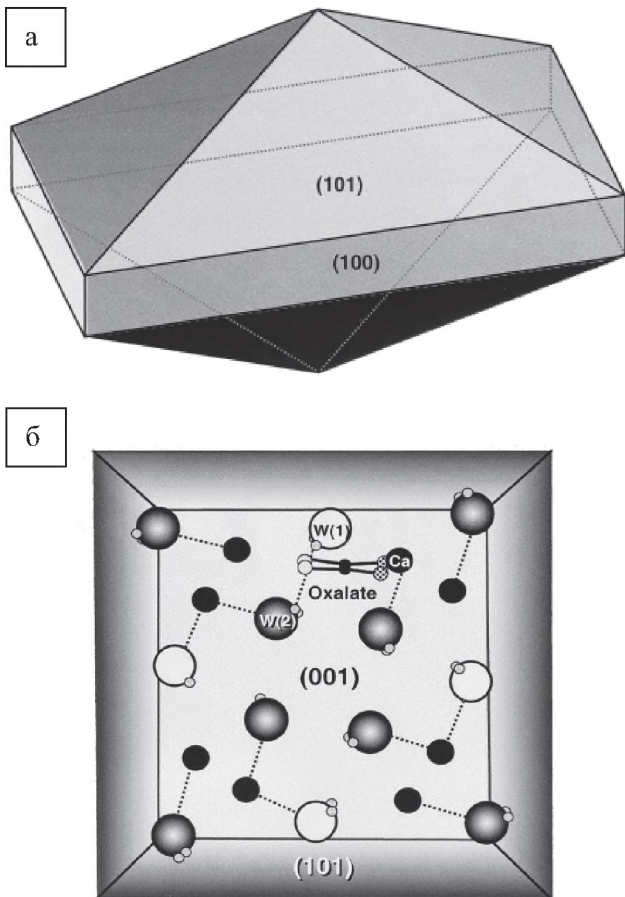


Рис. 1. а. Форма созревшего кристалла COD (по Lieske et al., 2001); б. Примерная схема атомной организации растущего кристалла COD (по Lieske et al., 2001).

долю моно-(COM) и дигидратов (COD) оксалата кальция (примерно 80% от общего количества камней) [34, 35]. Созревшие кристаллы имеют форму двойной пирамиды с восемью видимыми (101) гранями (рис. 1 а). Растущие кристаллы прирастают в основном за счет развития (001) грани (рис. 1 б).

Из последнего рисунка видно, что в пределах 001 грани располагаются ионы Ca^{2+} , а также атомы водорода и кислорода из молекул воды. Ионы оксалата обычно простираются на плоских поверхностях 100 и 001 граней и симметрично расположены им частях [29, 31].

Именно за счет присутствия в своем составе ионов Ca^{2+} кристаллы имеют большой положительный заряд [36]. Поэтому изначально возникло предположение, что адгезия кристаллов на клетке может обеспечиваться путем образования физико-химических связей с поверхностными молекулами, которые имеют соответствующий по величине отрицательный заряд. К таковым могут быть отнесены многие структурные компоненты гликокаликса клеток почечного эпителия – гликопротеины, гликолипиды, гликозаминогликаны и ряд других веществ.

Отметим, что согласно современным требованиям, при рассмотрении определенного вещества в качестве потенциального рецептора для кристаллов, к этому веществу предложен ряд обязательных критериев, которым оно должно соответствовать [23].

Критерии отнесения вещества к стимуляторам адгезии кристаллов:

- 1) Кристаллы должны связываться с клеткой в присутствии вещества;
- 2) Кристаллы не должны связываться с клеткой при отсутствии вещества;
- 3) Наблюдения должны подтверждать, что кристаллы напрямую взаимодействуют с веществом.

Разумеется, механизм такого сложного взаимодействия, как взаимодействие кристалл – клетка, вряд ли ограничивается образованием прямых физико-химических связей, однако, данный критерий многими весьма авторитетными учеными рассматривается как основной.

На современном этапе исследований к веществам, соответствующим вышеуказанным критериям, и, как следствие, могущим характеризоваться в качестве стимулятора адгезии кристаллов, относят сиаловую кислоту, фосфатидилсерин, аннексин II, гиалуронан, остеопонтин и связанный с нуклеолином протеин. Нижеследующие разделы нашего обзора будут посвящены рассмотрению роли каждого вещества в камнеобразовании, а также их возможным взаимодействиям.

Сиаловая кислота

Сиаловая (N-ацетилнейраминовая) кислота – ациальное производное нейраминовой кислоты, присутствующее во всех тканях и жидкостях организма животных и человека.

Сиаловая кислота (СК) является полифункциональным соединением, которое обладает выраженными кислотными свойствами и несет на себе большой отрицательный заряд. Эти свойства СК обусловлены присутствием в ее химической структуре свободной карбоксильной группы во втором положении (рис. 2). В обычных условиях СК в нативном виде, как правило, не встречается, а входит в состав различных углеводсодержащих веществ, таких как гликопротеины, гликолипиды (ганглиозиды), олигосахариды. Они обеспечивают структурные и функциональные свойства гликокаликса многих клеток, и в том числе, гликокаликса нефроцитов. Занимая в молекулах указанных веществ концевое положение, СК оказывает значительное влияние на их физико-химические свойства и биологическую активность. Определяя отрицательный заряд молекул гликопротеинов, СК обуславливает их вытянутую форму и, как следствие,

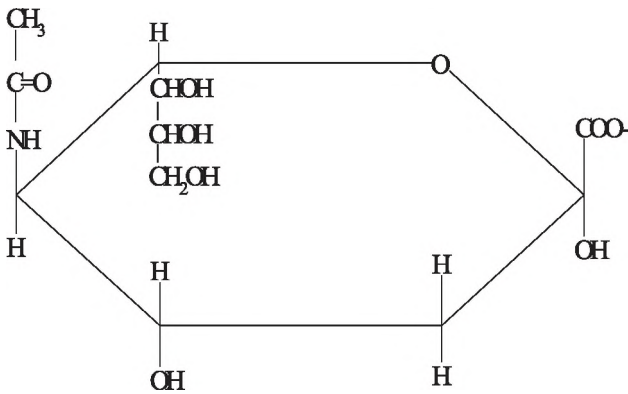


Рис. 2. Структура сиаловой кислоты.

высокую вязкость содержащих эти гликопротеины секретов.

Вышеназванные свойства СК, и в первую очередь ее высокий отрицательный заряд, вполне могут придавать ей способность стимулировать адгезию кристаллов на поверхности клеток уротелия.

Роль сиаловой кислоты в процессе камнеобразования была замечена достаточно давно. Еще в 1980 году при изучении состава органической матрицы почечных камней было обнаружено присутствие указанной кислоты во всех исследуемых образцах [37]. Позже эти результаты были неоднократно подтверждены другими экспериментами. На основе полученных данных был сделан вывод, что СК играет важную роль в патогенезе нефролитиаза, однако в чем заключается эта функция, оставалось неизвестным [38]. Само по себе присутствие СК в органической матрице камней могло интерпретироваться двояко. С одной стороны, это могло свидетельствовать о стимулирующей роли СК в процессе адгезии кристаллов, но, с другой стороны, могло демонстрировать и защитную функцию СК.

Многочисленные эксперименты опровергли предположение о возможной ингибирующей активности сиаловой кислоты в отношении процесса кристаллизации. Ни свободная, ни связанная СК не угнетала рост кристаллов в клеточной культуре [39]. Параллельно, многими исследователями было установлено, что удаление сиаловой кислоты с поверхности клеток приводит к значительному ослаблению связывания кристаллического материала [40]. Эти результаты позволили предположить, что СК является промоутером адгезии кристаллов. Поэтому дальнейшие исследования были направлены на установление механизмов, с помощью которых СК стимулирует образование комплекса кристалл – клетка.

Одни из первых экспериментов, подтверждающих роль сиаловой кислоты в рецепции кристал-

лов, были проведены в 1996 году в лаборатории колледжа Mayo (Рочестер, США) [36]. J.C.Lieske с соавторами зафиксировал прилипание кристаллов COM к почечным клеткам собак Madin-Darby (MDCK) и к клеточной культуре почечного эпителия африканских зеленых обезьян (BSC-1). При этом связывание кристаллов ослаблялось после предварительного инкубирования клеток с положительно заряженными соединениями. Это указывало, во-первых, на предпочтительную адгезию кристаллов к отрицательно заряженным компонентам клеточной поверхности и, во-вторых, на то, что влияние катионных соединений было обусловлено скорее воздействием на поверхность уротелия, чем на поверхность кристаллов [36]. С учетом того, что в значительной степени отрицательный заряд клеточной поверхности определяется терминальными остатками сиаловой кислоты этими же авторами было установлено, что адгезия кристаллов существенно ослабляется на фоне воздействия нейраминидазы (сиалидазы), фермента, специфически расщепляющего СК. Кроме того, было показано, что адгезия моногидрата оксалата кальция (COM) к клеткам уротелия ингибируется специфически для сиаловой кислоты лектинами, такими как агглютинин микроба пшеницы (WGA). Лектины – класс белков, способных быстро избирательно и обратимо связываться с сахарами. Данные белки распространены в природе повсеместно и входят в состав различных растений, микро- и макроорганизмов. При этом прикрепление кристаллов COM не изменялось после введения в культуру тканей различных лектинов, не имеющих аффинитета к сиаловой кислоте. На основании полученных результатов был сделан вывод, что СК может рассматриваться в качестве рецептора для связывания кристаллов [36]. Этот вывод отчасти подтверждается тем, что в сравнении со здоровыми людьми у больных МКБ наблюдаются различия в связывании СК с углеводами клеточной поверхности собирательных трубок [38]. Следует однако отметить, что пока не получено прямых неопровержимых доказательств того, что кристаллы образуют прямые физико-химические связи с молекулами СК.

Как бы то ни было, приведенные выше данные позволили цитируемым авторам сформулировать интересную концепцию кристаллизации [36, 41]. Согласно этой концепции в почечных канальцах постоянно и сбалансировано сосуществуют две популяции (поли)анионных соединений. Одна из них (сиаловая кислота) заякорена на апикальной мембране уротелия, а вторая (гликозаминогликаны, гликопротеины, цитрат) находится в свободном состо-

янии в канальцевой жидкости. Эти популяции анионов могут рассматриваться как конкуренты за взаимодействие с поверхностью микрокристалла. Изменения количественного и/или качественного состава анионных молекул и обуславливает сдвиг равновесия и определяет связывание кристаллов с клеточной поверхностью.

Изучение роли сиаловой кислоты в адгезии кристаллов было продолжено в лаборатории C.F.Verkoelen в медицинском центре Роттердама (Нидерланды) [40]. В качестве объекта исследований использовались сливающиеся и несливающиеся культуры тканей почек собак породы *Madin-Darby* (MDCK-I). Они характеризуются тем, что клетки сливающихся культур по своим функциональным свойствам подобны клеткам зрелого уротелия, тогда как несливающиеся культуры имеют сходство с клетками, находящимися в стадии пролиферации и миграции. Напомним, что кристаллы прикрепляются именно к таким клеткам, участвующим в репарации поврежденного эпителия.

Используя лектины, которые специфически связываются с СК, прикрепленной к галактозе в положениях α -2,3 (лектин *Maackia amurensis*, MAL II) и α -2,6 (лектин *Sambucus Nigra*, SNA), была проведена попытка установить, существуют ли отличия в функционировании сиаловой кислоты в клетках сливающихся и несливающихся культур. Оказалось, что клетки обоих типов одинаково обеспечены своеобразным «покрывалом», содержащим сиаловую кислоту, прикрепленную к галактозе с обеих сторон. Кроме того, введение в исследуемые культуры тканей еще одного лектина – агглютинина арахиса, (PNA), который связывается с галактозой только в положениях, лишенных СК, показало, что PNA прикрепляется к клеткам несливающихся культур, а связывание со сливающимися культурами наблюдается только после предварительной обработки нейраминидазой. Повидимому, это можно объяснить тем, что уровень сиализации выше на поверхности сливающихся и дифференцированных культур, что подтверждается при проведении метаболической маркировки [^3H]-глюкозамином. Здесь необходимо отметить, что изучение структуры углеводов клеточной поверхности в ходе дифференцировки клеток показало, что существуют четкие механизмы регуляции появления важных для развития клетки специфических олигосахаридов. Созревание гликокаликса сопровождается увеличением активности сиалилтрансферазы и последующим усилением сиализации терминальных остатков галактозы [42-44]. Иными словами, сиаловой кислоты на поверхности зрелого эпителия гораздо больше, чем на по-

верхности развивающихся клеток, и поэтому логично было бы предположить, что кристаллы должны легче связываться именно с клетками сливающихся культур. Однако, как показали эксперименты, уровень связывания кристаллов с поверхностью развивающихся культур был почти в 10 раз выше, чем таковой в развитых культурах. На первый взгляд, эти наблюдения противоречат гипотезе о стимулирующей роли сиаловой кислоты в рецепции кристаллов. Это противоречие еще более усиливается тем фактом, что свободная сиаловая кислота напрямую практически не взаимодействует с кристаллами (уровень связывания составил примерно 10%). Тем не менее, удаление СК с поверхности клеток как сливающихся, так и несливающихся культур при использовании нейраминидазы приводило к почти двукратному ослаблению адгезии кристаллов [40]. А эти результаты, в свою очередь, уже четко демонстрируют, что СК – стимулятор кристаллизации. Разрешение возникшего противоречия можно извлечь из гипотезы N. Mandel, который еще в 1998 году предположил, что адгезия кристаллического материала нуждается в комплиментарных молекулярных образованиях компонентов плазматической мембраны [45]. Согласно его идее, относительно низкий уровень сиализации глюкоконъюгатов на поверхности клеток несливающихся культур лучше сообщается с поверхностью кристалла, чем более глубоко упакованные молекулы сиаловой кислоты на поверхности высоко дифференцированных клеток. Другими словами, аффинитет люминальной поверхности клеток канальцевого эпителия для кристаллов оксалата кальция зависит от трехмерной организации в пространстве терминальных последовательностей сиаловой кислоты, простирающихся от поверхности клеток в периферическое пространство.

Эта идея впоследствии нашла экспериментальное подтверждение. Было установлено, что в обычных условиях кристаллы дигидрата оксалата кальция (COD) связываются с поверхностью клетки через грань 001. Но после предварительной обработки поверхности уротелия нейраминидазой адгезия COD осуществляется уже через грань 100 [29]. Вероятно, это обусловлено различным строением кристалла на этих гранях. Так, на грани 001 потенциальные сайты взаимодействия включают в себя и атомы кальция и молекулы воды, тогда как на грани 100 участки возможного соединения ограничиваются только атомами кальция. Структура грани 001 составлена набором атомов кислорода от двух кристаллографически независимых молекул воды совместно с ионами кальция. Каждый из этих атомов лежит точно на плоскости гра-

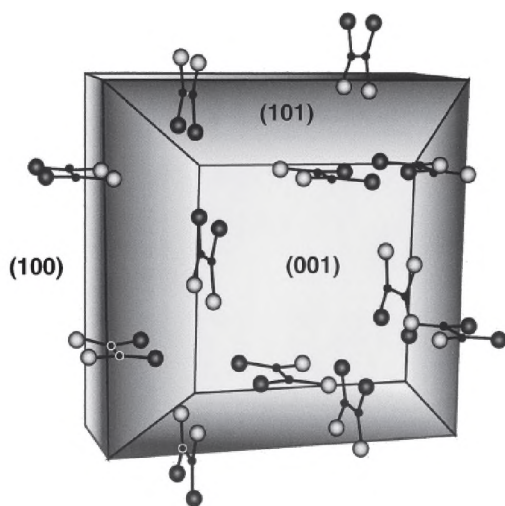


Рис. 3. Структурная организация 001 грани кристалла COD (по Lieske et al., 2001).

ни 001, т.к. они имеют нулевую высоту по оси С (рис. 3). Эта уникальная атомная организация определяет обширную сеть потенциальных участков взаимодействия кристалла с клеткой, которые могут образовывать не только ковалентные, но и водородные связи с анионными молекулами клеточной поверхности. В результате такой стереохимии грани 001 имеют большее сродство к уротелию. А, учитывая тот факт, что это сродство теряется после обработки клеточной поверхности нейраминидазой, можно сделать вывод – грань 001 кристаллов оксалата кальция взаимодействует преимущественно с молекулами сиаловой кислоты, имеющими комплементарное трехмерное строение.

С другой стороны, эти же эксперименты наглядно продемонстрировали, что сиаловая кислота не является единственным связывающим кристаллы веществом на клеточной поверхности, т.к. после удаления СК адгезия COD не прекращалась, хоть и осуществлялась через другую грань. Эти и ряд других наблюдений привели к формулированию гипотезы о том, что СК сама по себе слабо взаимодействует с кристаллом, но при этом является важным веществом, образующим своеобразные мосты между другими молекулами, участвующими в рецепции кристаллического материала, и поверхностью клетки почечного эпителия. Впоследствии были получены экспериментальные подтверждения данной гипотезы, подробное описание которых будет приведено ниже.

Таким образом, по современным представлениям можно выделить два наиболее вероятных механизма стимуляции сиаловой кислотой процесса кристаллизации. Во-первых, СК в определенной степени может образовывать физико-химические связи с кристаллами. При этом решающим фактором является не количество СК, а трехмерная орга-

низация ее молекул в пространстве. И, во-вторых, эта кислота может потенцировать связывающую активность других поверхностных молекул, вовлеченных в рецепцию кристаллов.

Остеопонтин

Остеопонтин – высоко фосфорилированный гликопротеин клеточной поверхности, включающий около 300 аминокислотных остатков, впервые был выделен из минерального матрикса бычьих костей в 1985 году [46]. В процессе изучения было установлено, что роль этого гликопротеина не ограничивается участием в костной минерализации. Оказалось, что остеопонтин является убиквитарным протеином и выявляется во многих тканях и жидкостях организма, включая кровь, мочу и молоко. Выяснилось также, что остеопонтин вовлечен в целый ряд физиологических и патологических процессов и событий, в том числе адгезию и миграцию клеток, продукцию цитокинов, воспаление, заживление и репарацию, аутоиммунные заболевания, канцерогенез [47-49]. Одновременно остеопонтин был обнаружен и в почечной ткани, где его экспрессия наиболее выражена в дистальных отделах нефрона [50, 51]. Мочевая форма остеопонтина имеет название уропонтин, а роль, которую он играет в почках, остается весьма загадочной и неопределенной.

Относительно роли этого гликопротеина в патогенезе нефролитиаза единого мнения до сих пор не существует. Большая часть исследователей склоняется к точке зрения, что остеопонтин является мощным ингибитором адгезии кристаллов на клеточной поверхности. Действительно, получены данные об угнетении остеопонтином нуклеации, роста и адгезии кристаллов оксалата кальция, показана способность гликопротеина прямо ингибировать связывание этих же кристаллов с культивируемыми клетками почечного эпителия [41, 52-54]. Представлены также свидетельства повышения экспрессии остеопонтина и его мРНК в почках *in vivo* в условиях экспериментального нефролитиаза [55-57]. И наконец, эксперименты, проведенные с использованием нокаутных мышей с мутацией гена, кодирующего остеопонтин, показали более высокую чувствительность этих животных к образованию кальций-оксалатных камней в условиях искусственной гипероксалурии [49, 58].

В то же время появились сведения противоположного характера, позволяющие позиционировать этот гликопротеин в качестве промоутера кристаллизации. Так, в 1996 году группа исследователей медицинского университета города Осака (Япония) в 1996 году провела изучение динамики связывания кристаллов оксалата кальция с MDCK клет-

ками [59]. По условиям эксперимента ткани культивировались совместно с остеопонтином, а также с тромбином, известным ингибитором остеопонтина, после чего методом сканирующей электронной микроскопии детектировались изменения адгезии кристаллов и концентрации изотопа кальция (^{45}Ca) вокруг клеток. Оказалось, что концентрация ^{45}Ca в кристаллах, прикрепленных к клеткам, на фоне остеопонтина была в 1,4 раза выше, чем в контроле. В то же время, величина аналогичного показателя в условиях инкубирования клеток с тромбином составила лишь половину от контрольного уровня. На основании данных наблюдений авторы сделали вывод, что остеопонтин стимулирует рецепцию кристаллов [59]. Позднее эта же группа исследователей представила результаты еще ряда экспериментов, демонстрирующих роль остеопонтина в процессе камнеобразования. В частности, ими было обнаружено, что античувствительные олигонуклеотиды, сообщаемые с соответствующими частями генома, кодирующими аминокислотную последовательность остеопонтина, не только ингибировали его экспрессию в MDCK-клетках, но и зависимо от концентрации уменьшали инкорпорирование ^{45}Ca в кристаллы оксалата кальция [60]. Наконец, при количественном определении степени стимулирования камнеобразования было установлено, что депонирование кристаллов уменьшалось более чем на 80% после подавления связывания остеопонтина с клеткой с помощью специфических поликлональных антител. В условиях обработки тромбином величина описываемого показателя уменьшалась на 50-80%, после применения циклического аргинин-глицин-аспартат пептида – на 60-80%, и после обработки клеток туникамицином – на 50-60% [61]. Сходные результаты были получены и в ряде других исследований японских авторов [62, 63].

Проведенные эксперименты демонстрируют, что остеопонтин обладает способностью стимулировать адгезию кристаллов на поверхности клеток. Справедливости ради отметим, что подобных результатов на сегодняшний день не так много, а большинство авторов все же склоняется к мнению об ингибирующей роли остеопонтина в отношении камнеобразования. Тем не менее, нельзя сбрасывать со счетов и вышеуказанную точку зрения.

Как можно объяснить столь противоречивые результаты? Вопрос этот пока остается открытым. Не исключено, что остеопонтин при уролитиазе играет модулирующую роль, проявляя себя и как стимулятор, и как ингибитор кристаллизации в зависимости от определенных обстоятельств. Одним из таких обстоятельств, по-видимому, могут

стать посттрансляционные модификации молекулы остеопонтина. Эти модификации, как установлено, включают фосфорилирование, гликозилирование и сульфатирование гликопротеина [64-67]. Очевидно, степень фосфорилирования остеопонтина имеет прямое отношение к процессу минерализации. По крайней мере, способность ингибировать рост кристаллов гидроксиапатита значительно ослаблялась при дефосфорилировании молекулы остеопонтина, а фосфорилирование, напротив, существенно усиливало его ингибирующую активность в отношении роста кристаллов СОМ [54, 68]. Аналогичные закономерности выявлены в костной ткани, где фосфорилирование рекомбинантного остеопонтина быка усиливало *in vitro* адгезию остеокластов, тогда как частичное дефосфорилирование подавляло этот процесс [69-70]. Сходным образом остеопонтин стимулирует костную резорбцию, только если он должным образом фосфорилирован [71]. Высказанная идея подтверждается результатами недавнего исследования, в котором остеопонтин молока, имеющий 28 мест фосфорилирования, индуцировал образование и рост гидроксиапатита в отличие от костного остеопонтина, модифицированного с помощью 13 фосфатных остатков и ингибировавшего эти процессы [72]. Сходные сведения, полученные и в других исследованиях, указывают на то, что фосфорилирование может представлять собой ключевой момент, определяющий функциональную активность остеопонтина в ходе кристаллизации оксалата кальция в моче [54, 73].

Отдельно следует отметить данные о рецепторах остеопонтина. Установлено, что кроме взаимодействия гликопротеина с целым рядом интегринов, что обуславливает многие аспекты клеточной активности, в том числе адгезию, миграцию, хемотаксис, иммунное модулирование, остеопонтин является лигандом некоторых вариаций рецептора CD44 [73, 74]. Известно, что этот рецептор является убиквитарным трансмембранным гликопротеином, также вовлеченным во многие процессы, включая воспаление [75]. Экспрессия рецепторов CD44 в почках резко возрастает при различных патологических состояниях, включая нефролитиаз, когда они четко определяются на апикальной поверхности кристалл-связывающих клеток дистального нефрона [76]. Интересным и интригующим является то, что этот гликопротеин является рецептором как для остеопонтина, так и для гиалуронана, считающегося сегодня основным промоутером камнеобразования в почках [77-79]. Гиалуронан будет охарактеризован нами отдельно, однако отметим, что, учитывая сходство в

трансдукции сигнала, между остеопontiном и гиалуронатом могут существовать определенные (возможно, реципрокные) взаимоотношения, результирующие в усилении рецепции кристаллического материала. В дополнение отметим, что у крыс почечная экспрессия рецептора CD44, равно как и гиалуронана и остеопонтинина, резко возрастала в поврежденных и регенерирующих клетках канальцевого эпителия параллельно с активацией процесса кристаллизации [74]. Этот факт позволил авторам цитируемой работы высказать предположение, согласно которому задержка кристаллов в почке требует повреждения эпителия канальцев в сочетании с апикальной экспрессией гиалуронана, остеопонтинина и CD44 [74].

Таким образом, можно заключить что роль остеопонтинина в процессе камнеобразования остается не до конца выясненной. Существуют убедительные подтверждения как его ингибирующей, так и стимулирующей активности по отношению к адгезии кристаллов клеточной поверхностью. Вероятно, остеопонтинин может проявлять модулирующие свойства в зависимости от определенных условий, главным из которых можно полагать степень посттрансляционной модификации его молекулы.

Фосфатидилсерин

В 1988 году группа исследователей под руководством S.R.Khan из университета Ганесвилла (Флорида, США) установила, что кристаллы оксалата кальция содержат в своем составе некоторое количество липидов. При этом в условиях *in vitro* липидная матрица проявила себя как активный нуклеатор кристаллов CaOx в метастабильном растворе [80, 81]. Впоследствии в этой же лаборатории было установлено, что мембраны клеток ренального эпителия участвовали в процессе кристаллизации солей кальция в почках самцов и самок крыс, а мембраны пузырьков щеточной каймы, изолированные из почек крыс, стимулировали образование кристаллов оксалата кальция. Так, удаление из мочи человека мембранных фракций с помощью фильтрования или центрифугирования приводило к резкому ослаблению индуцированной кристаллизации по сравнению с цельной мочой, а добавление смеси мембранных фосфолипидов вновь активировало этот процесс [82]. Эти наблюдения послужили основанием для предположения о том, что в процессе камнеобразования определенную стимулирующую роль играют мембранные фосфолипиды [83, 84]. Более того, было установлено, что на фоне нуклеации кристаллов оксалата кальция в присутствии кислых фосфолипидов происходит образование нерастворимого комплекса кальций – фосфатидилсерин [81]. Таким образом,

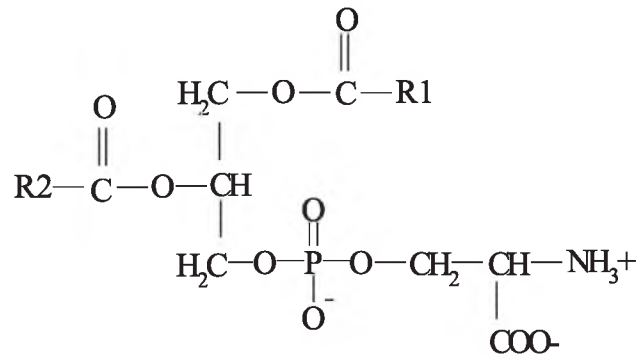


Рис. 4. Структура фосфатидилсерина.

было предположено, что основным мембранным фосфолипидом, участвующим в процессе адгезии кристаллов является именно фосфатидилсерин.

Фосфатидилсерин (ФС) относится к группе глицерофосфолипидов, которые являются производными фосфатидной кислоты. В их состав обычно входят глицерин, жирные кислоты, фосфорная кислота и азотсодержащее соединение. В молекуле фосфатидилсерина таким азотсодержащим соединением является аминокислота серин (рис. 4). Именно за счет данного аминокислотного остатка ФС обладает выраженными кислотными свойствами и несет на себе большой отрицательный заряд. Поэтому ФС может активно взаимодействовать с положительно заряженными кристаллами оксалата кальция.

Как известно, в норме ФС локализуется исключительно во внутреннем слое клеточной мембраны как результат его направленного внутрь клетки транспорта, обеспечиваемого энергозависимым ферментом аминокислотный фосфолипид трансферазой. Это означает, что в обычных физиологических условиях ФС не способен стимулировать адгезию кристаллов [22, 23]. Данный факт хорошо согласуется с мнением о том, что неповрежденный эпителий защищен от прикрепления кристаллического материала. В то же время, установлено, что на фоне повреждения тканей происходит структурная перестройка мембраны, в результате чего молекулы ФС появляются во внешнем липидном слое. Для этого существует два принципиальных пути: потеря симметрии мембранных липидов и потеря полярности клеток канальцевого эпителия. Благодаря исследованиям группы N.S.Mandel показано, что на фоне использования кальциевого ионофора А-23187, изменяющего структуру мембраны клеток IMCD, а также при обогащении культуры ткани фосфолипидными суспензиями или добавлением оксалата происходит значительное усиление адгезии кристаллов. При этом фиксировалась секвестрация ФС с внутренней поверхности мембраны, с

одновременным индуцированием его экспрессии на наружной поверхности [85-87]. Важно отметить, что в указанных экспериментальных условиях введение аннексина V значительно ослабляло прикрепление кристаллического материала к поверхности клетки [86, 88]. Аннексин V – это белок, который избирательно связывается с анионной частью фосфатидилсерина, блокируя его активность [89]. Представленные результаты наглядно демонстрируют стимулирующую роль ФС в процессе камнеобразования.

Потеря мембранной липидной симметрии, вероятнее всего, является результатом апоптоза или клеточного повреждения. Скорость апоптоза в почке является достаточно высокой в связи с постоянно происходящим ремоделированием нефронов. Этот процесс, как правило, четко контролируется, но может неадекватно активироваться в ответ на ишемическое или токсическое повреждение почечных канальцев [90, 91]. Неапоптозное повреждение может быть индуцировано физическими факторами, каковыми являются кристаллы, метаболическими нарушениями или воздействием лекарственных препаратов. И во всех этих ситуациях фосфатидилсерин, по-видимому, оказывается экспонированным на апикальную мембрану почечных канальцев, где участвует в процессе образования нерастворимых комплексов с ионами кальция [92]. Приведенные сведения убеждают, что ФС появляется на внешней поверхности мембраны только в условиях возникновения описанной выше асимметрии. Существует предположение о том, что активатором экспрессии ФС могут являться ионы кальция, локализованные внутри клетки [23].

Второй путь структурной перестройки мембраны, приводящий к изменению полярности клеток, возникает при некоторых патологических состояниях, сопровождающихся ишемическим повреждением уротелия, микроворсинок, при почечном поликистозе [93, 94]. При этом делящиеся клетки в процессе репарации не обретают полярность до тех пор, пока не организовались плотные стыки между ними и не образовались апикальный и базолатеральный домены [94]. В эксперименте потеря полярности достигается применением ЭДТА, разрушающего плотные межклеточные контакты [92, 95]. В экспериментальной ситуации, описанной выше, происходит изменение полярности клеточной мембраны. В этих условиях нарушается строгий порядок расположения апикальных и базолатеральных компонентов мембраны, и, по сути, происходит их смешивание, т.е. часть люминальных компонентов переходит на базальную сторону и наоборот [85].

Необходимо отметить, однако, что адгезия кристаллов оксалата кальция происходит (хотя и менее интенсивно) как на фоне потери полярности, так и в условиях ассиметрической перестройки мембраны. Эти указания на то, что набор промоторов рецепции кристаллов (кандидатов в кристалл-связывающие молекулы) не ограничивается фосфатидилсерином.

Добавим, что некоторые авторы сомневаются в самостоятельной значимости ФС, как кристалл-связывающей молекулы. Они приписывают ФС в основном вспомогательные функции при взаимодействии разных стимуляторов камнеобразования между собой. Это взаимодействие будет рассмотрено нами отдельно.

Таким образом, анионный глицерофосфолипид фосфатидилсерин обладает способностью стимулировать прикрепление кристаллов к клеточной поверхности, а значит, может рассматриваться в качестве промотора камнеобразования. При этом его активность наблюдается не при всех формах повреждения клетки, а лишь при тех, которые сопровождаются изменением симметрии клеточной мембраны. Кроме того, ФС, по-видимому, обладает способностью усиливать активность других кристалл-связывающих молекул.

Белок, связанный с нуклеолином

Относительно недавно поиск новых кристалл-связывающих молекул привел к обнаружению на мембране клеток еще одного гликопротеина, который обладает способностью взаимодействовать с кальциевыми кристаллами. Изучение строения этого гликопротеина показало, что его аминокислотная последовательность на 83% идентична таковой для нуклеолина крыс [96]. Как известно, нуклеолин – основной ядерный фосфопротеин. Он имеет массу примерно 110 kDa, и рассматривается в качестве фактора транскрипции для прерибосомального синтеза РНК. Изначально он локализуется в плотном регионе ядрышек, но в определенных ситуациях также обнаруживается в цитоплазме. Как оказалось, нуклеолин может появляться и на клеточной поверхности, где он, связываясь с мембранами, функционирует как рецептор для липопротеинов, вирусов, внеклеточной матрицы, факторов роста и др. молекул [97-102]. Идентифицированный гликопротеин получил название «белок, связанный с нуклеолином» (nucleolin-related protein, NRP). Описываемый белок подобно нуклеолину имеет молекулярную массу 110 kDa. При этом и NRP, и сам нуклеолин распознаются одними и теми же антинуклеолиновыми антителами [103]. Поэтому обнаруженный белок можно рассматривать в качестве нового члена семейства белков нуклео-

лина. В то же время, компьютерный анализ аминокислотной последовательности NRP показал, что имеются некоторые отличия от молекулы нуклеолина. Так, различаются потенциальные участки гликозилирования; белок, связанный с нуклеолином, имеет больше точек фосфорилирования. Установлено, что роль нуклеолина в значительной степени определяется функциональным состоянием клетки. Показано, например, что в растущих клетках этот протеин постоянно перемещается между цитоплазмой и ядром, выполняя роль своеобразного челнока, участвующего в транспорте рибосомальной РНК [104-106]. И в этих условиях он может обнаруживаться на поверхности клеток. Продемонстрировано, что при этом нуклеолин взаимодействует с ламинином, который является главным компонентом базальных мембран [107, 108]. Эксперименты, проведенные в 2004 году в США, показали, что NRP может локализоваться как на базальной, так и на апикальной мембране клеток, причем в пролиферирующих клетках значительно увеличивается его количество именно на люминальной стороне, достигая пика на поздних стадиях митоза. Важно отметить, что это увеличение на культуре клеток IMCD сопровождалось усилением адгезии кристаллов оксалата кальция [109].

Предполагаемый механизм рецепции кристаллов гликопротеином NRP выглядит следующим образом. Важной особенностью структуры NRP является присутствие длинных отрезков остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот, составляющих 62% длины его молекулы. Эти отрезки формируют два больших отрицательно заряженных участка NRP, которые за счет электростатического взаимодействия образуют физико-химические связи с положительно заряженными ионами кальция [109]. Как полагают эти же авторы, в обычных условиях такое строение позволяет NRP функционировать в качестве белка, обеспечивающего хранение ионов кальция в эндоплазматическом ретикулуме. Однако, в процессе повреждения, пролиферации и миграции клеток описываемый гликопротеин, появляясь на апикальной мембране, взаимодействует с положительно заряженными регионами кристаллов оксалата кальция, обеспечивая адгезию последних на поверхности клеток почечного эпителия.

Таким образом, белок, связанный с нуклеолином, может рассматриваться в качестве кристалл-связывающей молекулы. Это свойство обусловлено наличием в его структуре кислых отрицательно заряженных участков, связывающихся с ионами кальция, что облегчает процесс адгезии кристаллов.

Аннексин II

При изучении других мембранных протеинов, способных участвовать в рецепции кристаллов, ряд авторов неожиданно обнаружил неизвестный белок с молекулярной массой 37 kDa, обладавший способностью мощно стимулировать адгезию кристаллического материала. Изучение аминокислотной последовательности идентифицировало этот протеин как аннексин II. В дальнейшем было показано, что на фоне предварительной обработки клеток уротелия специфическими для этого протеина моноклональными антителами прикрепление кристаллов к поверхности клеток значительно ослабляется, хотя и не исчезает полностью [110]. Эти результаты свидетельствуют о том, что, с одной стороны, аннексин II является стимулятором камнеобразования, но, с другой стороны – не единственным стимулятором этого процесса.

Аннексин II – представитель большого семейства белков, объединенных под названием аннексины. Биологическая роль этих белков заключается в регуляции обмена кальция внутри клетки. Их отличительной структурной особенностью является наличие протеинового ядра, включающего свободную карбоксильную группу [111]. Именно это ядро определяет способность аннексинов связываться с мембраной и ионами кальция. Молекула аннексинов формирует в пространстве плотно упакованный α -спиральный диск с небольшими искривлениями. Выпуклая сторона обращена к мембране и содержит кальций-связывающие регионы. NH_2 -терминальный остаток перемежается с вогнутой поверхностью, где может связываться с различными субстанциями, включая цитоскелет. Протеиновое ядро с $-\text{COOH}$ группой содержит 4 повторения длиной примерно по 70 аминокислот, каждое из которых включает кальций-связывающий регион (порядка 38 аминокислот). Полагают, что этот COOH -терминальный регион является «сердцем» протеина, обеспечивающим его мембранно- и кальций-связывающие свойства [111].

Характеризуя особенности строения аннексина II, необходимо отметить, что в отличие от других представителей данного семейства, его NH_2 -терминальный остаток может связываться с димером p11, в результате чего присоединяется еще одна молекула аннексина II через ее NH_2 -группу. Считается, что образовавшийся тетрамер Ax-II-p11, который в физиологических условиях предназначен для связывания двух мембран, может связывать кристаллы оксалата кальция. Известно также, что аннексин II взаимодействует с мембранными молекулами холестерина через независимый от кальция механизм. Поэтому кальций-свя-

зывающие регионы остаются свободными, а значит, могут участвовать в рецепции кристаллов [111].

Необходимо отметить, что аннексин II, как и все остальные белки этого семейства, изначально локализуется внутри клетки [112]. Тем не менее, в определенных ситуациях он может появляться и на внешней стороне мембраны различных клеток (кератиноциты, эндотелиальные клетки, клетки глиомы и гладкой мускулатуры), где может функционировать в качестве рецептора для цитомегаловирусов, дигидрохолекальциферола и других молекул [113-116]. Например, в эндотелии, как показали расчеты, связанный с мембранами аннексин-II составляет приблизительно 4% от его общего содержания в клетке [114]. Интересные данные были получены при экспериментальном моделировании на культурах почечной ткани болезни Дента (Dent's disease). Данная патология характеризуется генетическими нарушениями, следствием которых становятся протеинурия, гиперкальциурия, нефрокальциноз, нефролитиаз и, в конечном итоге, почечная недостаточность. Этиология болезни Дента заключается в мутации гена *CLCN5*, кодирующего почечные хлорные каналы. Оказалось, что экспериментальное разрушение гена *CLCN5* вызывает перемещение аннексина II из цитоплазмы на люминальную поверхность мембраны, сопровождающееся усилением связывания кристаллов оксалата кальция, которое блокируется специфическими моноклональными антителами [117]. Тем не менее, несмотря на имеющиеся результаты, механизмы появления аннексина II на апикальной мембране нефроцитов остаются до сих пор не до конца выясненными. D.A. Siever и H.P. Erickson предположили, что аннексин II и вовсе может являться структурным белком, интегрированным в апикальную мембрану нефроцитов, т.к. в эксперименте после обработки мембраны раствором Na_2CO_3 (реагента, который гидролизует связи аннексина с поверхностью клетки) аннексин II по-прежнему обнаруживался на апикальной поверхности клеток [112]. Кроме того, было установлено, что мРНК аннексина II активно экспрессируется в некоторых эпителиальных клетках, находящихся в стадии митоза [118].

Следует отметить еще одну важную особенность аннексина II. Как было установлено группой J.C.Lieske и F.G.Toback, кристаллы моногидрата оксалата кальция после прикрепления к поверхности клетки проникают в цитоплазму путем эндоцитоза, где активируют экспрессию некоторых ранних генов, остеопонтина, а также стимулируют деление клетки [119-124]. Этот факт обусловил появление предположения о важной патогенетичес-

кой роли интернализации кристаллов, что будет подробно рассмотрено нами в свое время. Возвращаясь к аннексину, отметим, что на поверхности клетки он локализован с белком кавеолином-1 [110]. Как известно, кавеолин-1 – это ключевой протеин, обеспечивающий процессы экзо- и эндоцитоза [125, 126]. Поэтому, вполне возможно, что аннексин II опосредованно участвует в поступлении кристалла внутрь клетки.

Таким образом, аннексин II является еще одним кристалл-связывающим веществом, роль которого в рецепции оксалата кальция доказана экспериментально.

Гиалуронан

Хорошо известно, что помимо сиаловой кислоты в общий отрицательный заряд мембраны вносят существенный вклад гликозаминогликаны (ГАГ) [23, 127]. Поэтому на основании общих принципов взаимодействия кристалл-клетка возникло предположение, что ГАГ могут являться кристалл-связывающими молекулами. В почке основные ГАГ – это хондроитин сульфат, гепаран III и гиалуронан. Как показали эксперименты, в процессе пролиферации клетки адгезия кристаллов может быть уменьшена хондроитиназой ABC или тестикулярной гиалуронидазой, но не гепариназой III. Таким образом, была исключена возможная роль гепарана сульфата в процессе связывания кристаллов. Дальнейшие эксперименты продемонстрировали, что на фоне обработки почечной ткани гиалуронидазой грибов рода *Streptomyces*, т.е. фермента, который специфически расщепляет гиалуронан, прикрепление кристаллического материала к поверхности клетки существенно ослабляется. Это позволило идентифицировать гиалуронан в качестве кристалл-связывающей молекулы [127]. Основанием для этого стали следующие доказательства: 1 – очищенный гиалуронан напрямую взаимодействует с кристаллами СОМ; 2 – поверхность клеток несливающихся культур содержит намного больше чувствительного к гиалуронидазе грибов *Streptomyces* материала, чем у сливающихся структур; 3 – обработка гиалуронидазой значительно снижает связывание кристаллов с несливающимися культурами; 4 – при помощи конфокального сканирующего лазерного микроскопа было показано, что гиалуронан действительно экспрессируется в притягивающих кристаллы клетках развивающихся культур, и не экспрессируется в клетках развитых культур; 5 – после механического повреждения интактных клеток, СОМ кристаллы селективно адгезировались на поверхности экспрессирующих гиалуронан пролиферирующих и мигрирующих клеток в ране [21, 127].

Приведенные экспериментальные данные, полученные в лаборатории J.C.Lieske, неопровержимо свидетельствуют, что гиалуронан является кристалл-связывающей молекулой. Подчеркнем, что на сегодняшний день этот ГАГ считается главным веществом, участвующим в рецепции кристаллов. Более того, некоторые исследователи категорично утверждают, что гиалуронан – единственный рецептор для кристаллов, а все остальные макромолекулы, описанные в нашем обзоре, лишь регулируют экспрессию и активность гиалуронана [23].

В недавнем аналитическом обзоре С.Ф. Verkoelen приводит подробные сведения относительно функциональной роли гиалуронана в нормальных и патологических условиях [24].

Гиалуронан (гиалуроновая кислота) – это линейный гликозаминогликан, который состоит из множества остатков глюконовой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Эукариотические клетки продуцируют гиалуронан различной молекулярной массы – от экстремально высокой ($M_r > 10^6$) до очень малой ($M_r \approx 2 \cdot 10^4$). Было подсчитано, что поскольку один дисахарид имеет массу около 400 kDa, гиалуронан представляет собой цепочку из более чем 2500 дисахаридных остатков [24]. Вследствие того, что гиалуронан имеет структуру «случайно развернутой катушки», его олигосахаридные цепи занимают огромные области ткани со способностью притягивать большие количества жидкости. Гидратированная матрица обеспечивает окружающую микросреду, которая является регулятором в формировании клетки и эпителиальной архитектуре в ходе динамических морфогенетических процессов, таких как воспаление, репарация, развитие эмбриона и канцерогенез [130]. Важным является то, что гиалуронан влияет на функциональную активность клеток посредством взаимодействия с такими мембранными рецепторами как CD 44 и CD 168 [128-130]. Полагают, что высокомолекулярный гиалуронан образует внеклеточную матрицу в соединительных тканях, а также участвует в процессах адгезии иммунных клеток, рецепторной передачи сигнала, подавлении иммунитета и т.д. Низкомолекулярный гиалуронан обладает ангиогенными, иммуностимулирующими и провоспалительными функциями [129, 131]. Гиалуроновая кислота имеет принципиальные структурные и функциональные отличия от других ГАГ – она не сульфатирована, не продуцируется в аппарате Гольджи и не инкорпорируется в протеогликаны. Гиалуронан образуется ферментом гиалуронансинтазой (HAS) на внутренней стороне цитоплазматической мембраны, после чего

полимеризуется и выталкивается через мембрану во внеклеточное пространство. У млекопитающих идентифицировано 3 гена, кодирующих экспрессию гиалуронансинтазы. HAS1 считается так называемым housekeeping геном, а HAS2 и HAS3 – это регуляторные энзимы [132]. В катаболизм гиалуронана вовлечены уже упоминавшийся рецептор CD 44, гиалуронидаза (Hyal) и два лизосомальных фермента – β -глюкуронидаза и β -N-ацетилглюкозаминидаза. Три гена, кодирующих соответствующие типы гиалуронидазы, находятся на хромосоме 3p21.3. Известно, что гиалуронидазы 1 и 2 являются основными ферментами соматических тканей. Гиалуронидаза 2 прикреплена к мембране гликозилфосфатидилинозитольными связями и расщепляет высокомолекулярный гиалуронан до конечных продуктов размером примерно 50 олигосахаридов. Гиалуронидаза 1 лизирует гиалуронан до мелких олигосахаридов в лизосомах при соответствующем значении pH. Отметим, что в почках преимущественно функционирует первый тип фермента, который расщепляет гиалуронан до продуктов размером порядка 15 олигосахаридных остатков [131, 133-135].

Гиалуронан играет важную роль в процессе развития почечной ткани. Так, например, мыши с генетическим недостатком HAS2 имеют менее гидратированную и более компактную внеклеточную матрицу. Эти мыши погибают еще в эмбриональном периоде [136]. На развивающихся почках эмбриона цыпленка было показано, что гиалуронан накапливается на ранних стадиях формирования канальцевого эпителия, снижаясь в ходе дифференциации параллельно с повышением активности гиалуронидазы [137]. Кроме того, установлено, что мРНК гиалуронансинтазы 2 и ее соответствующий продукт накапливаются в развивающихся клеточных культурах, и угнетаются в зрелых тканях [138].

В норме гиалуронан присутствует в интерстиции мозгового вещества почки и практически не обнаруживается в корковом веществе и канальцах [24]. В мозговом веществе он обеспечивает структурную поддержку сегментов нефрона и кровеносных сосудов, а также играет важную роль в процессе обращения воды в почках. Установлено, что гиалуронан участвует в реализации эффекта антидиуретического гормона. Последний, стимулируя соответствующие рецепторы, активирует связанную с ними гиалуронидазу, которая расщепляет гиалуронан, обеспечивая транспорт воды через мембрану. Установлено, что экспрессия гиалуронана напрямую зависит от активности вазопрессина и объема мочи. При этом прослеживается

четкая обратная зависимость между содержанием гиалуронана и активностью Hyal [139]. Таким образом, сегодня подтверждены выдвинутые полвека назад блестящие идеи А.Г.Гинецинского о том, что регуляторная роль вазопрессина в процессе реабсорбции воды осуществляется путем модулирования активности гиалуронидазы [140, 141]. Показано, что в условиях водной депривации активность этого фермента выше, а значит самого гиалуронана меньше и, наоборот, на фоне водной нагрузки его количество увеличивается, а активность Hyal – падает [142, 143-145]¹. Важно отметить, что экспрессия гиалуронана существенно увеличивается в патологических условиях, таких как воспаление, ишемия, аутоиммунные повреждения почки, отторжение пересаженной почки, острый некроз канальцев и отравление этиленгликолем [74, 76, 146-149]. Причем этот процесс происходит в тех регионах почки, где в норме гиалуронан никогда не встречается – на апикальной мембране канальцев и в интерстиции коркового вещества [74, 76, 146, 149]. В дополнение напомним, что экспериментально доказана активация синтеза гиалуронана в клетках несаливающих культур, в то время как нефроны развитого эпителия его не синтезируют. Приведенные данные хорошо согласуются с наблюдениями, показывающими, что адгезия кристаллов начинается только в условиях повреждения почечных тканей.

Характеризуя механизм рецепции кристаллов гиалуронаном, еще раз отметим важные особенности его химического строения. Мономерные дисахариды содержат в своей структуре свободную карбоксильную группу, приобретая за счет нее кислотные свойства и высокий отрицательный заряд. При этом большое количество дисахаридных остатков обеспечивает наличие соответствующего числа карбоксильных групп. Кроме того, особенности пространственной конфигурации его молекулы обуславливают высокую общую реакционно-способную площадь. Вследствие такой структуры гиалуронан поглощает огромное количество молекул воды, в результате чего внеклеточная матрица приобретает вид очень вязкого студенистого геля (вероятно, в этом заключается важный биологический смысл защиты развивающихся кле-

ток). Не исключено, что проплывающие по нефрону кальциевые микрокристаллы попросту механически застревают в этой вязкой матрице [23, 150]. Кроме того, свободные карбоксильные группы гиалуронана реагируют с ионами кальция, входящими в состав кристаллов, образуя с ними физико-химические связи [24]. В результате этих двух процессов гиалуронан прочно связывает большое количество кристаллического материала, причем, как было показано в эксперименте, адгезия кристаллов к этому «покрывалу» не может быть предотвращена физиологическими концентрациями почечных ингибиторов кристаллизации [151]. Это позволило авторам последней работы предположить, что после повреждения ткани естественные защитные механизмы не способны предотвратить процесс нуклеации кристаллов. В дополнение отметим, что гиалуронан, адгезируя кристаллы апатита (фосфата кальция), участвует в формировании так называемых бляшек Рэндала [24]. Давно и хорошо известно, что эти бляшки играют роль своеобразного якоря, к которому прикрепляются кристаллы оксалата кальция, способствуя росту камней [152].

Суммируя все вышеизложенное, резюмируем, что на современном этапе исследований выделяют несколько кристалл-связывающих молекул, главной из которых, по-видимому, является гиалуронан. Прямое участие в рецепции кристаллов других молекул – сиаловой кислоты, остеопонтина, фосфатидилсерина, аннексина II, связанного с нуклеолином белка, не имеет неопровержимых доказательств, хотя их роль в адгезии кристаллического материала не вызывает сомнений. Более того, энзиматическое удаление гиалуронана с поверхности клеток снижает адгезию кристаллов лишь на 50% [127]. Эти результаты свидетельствуют о том, что описанные молекулы (или некоторые из них) все-таки реагируют с кристаллами. Однако многие авторы считают, что эти вещества все же имеют лишь вспомогательное значение, выполняя функцию регуляторов активности гиалуронана. Поэтому следующий раздел нашего обзора будет посвящен возможным взаимодействиям кристалл-связывающих молекул.

Заключение

В заключение обзора суммируем приведенные данные и попытаемся сформулировать наиболее вероятный общий механизм процесса кристаллизации в почках.

В норме клетки уротелия не восприимчивы к воздействию кристаллического материала. Однако при повреждении нефроцитов активируется репарация тканей. В этот период появляются клет-

¹ От редакции. Тезис о том, что гиалуронидазный механизм имеет существенное значение в реализации гидроосмотического эффекта вазопрессина представляется нам весьма спорным, хотя сам факт активации гиалуронидазной системы почек под влиянием данного пептида отрицать нельзя. Скорее следует согласиться с общепринятыми представлениями о том, что усиление транспорта воды при действии антидиуретического гормона происходит вследствие активации V₂-рецептора и последующего встраивания аквапорина-2 в апикальные мембраны клеток эпителия медуллярных отделов собирающих трубок.

ки, находящиеся в стадии миграции и пролиферации. Именно в эти моменты на апикальной поверхности клеток экспрессируются ряд кристалл-связывающих молекул, модулирующих адгезию кристаллов. Ключевую роль в этом процессе играет гиалуронан. Образуя вязкое клеточное «покрывало», он механически улавливает кристаллы. Этот момент нам представляется очень важным, поскольку быстро протекающие с током мочи кристаллы попросту не успевают химически прореагировать с другими мембранными кристалл-связывающими молекулами. Вязкая внеклеточная матрица останавливает ток кристаллов, и уже после этого подключается прямое физико-химическое взаимодействие положительно заряженных кристаллов с молекулами, имеющими отрицательный заряд. В результате на бляшках Рэндела начинается нуклеация кристаллов, в конечном итоге определяющая образование почечных камней.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Kok DJ. Crystalization and stone formation inside the nephron. *Scanning Microsc* 1997; 10: 471-485
- Thamilselvan S, Hackett RL, Khan SR. Lipid peroxidation in ethylene glycol induced hyperoxaluria and calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol* 1997; 157 (3): 1059-1063
- Thamilselvan S, Khan SR. Oxalate and calcium oxalate crystals are injurious to renal epithelial cells: results of in vivo and in vitro studies. *J Nephrol* 1998; 11 (1): 66-69
- Khan SR, Thamilselvan S. Nephrolithiasis: a consequence of renal epithelial cell exposure to oxalate and calcium oxalate crystals. *Mol Urol* 2000; 4 (4): 305-312
- Khan SR. Crystal-induced inflammation of the kidneys: results from human studies, animal models and tissue-culture studies. *Clin Exp Nephrol* 2004; 8 (2): 75-88
- Koul H, Kennington L, Nair G et al. Oxalate-induced initiation of DNA synthesis in LLC-PK1 cells, a line of renal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 1632-1637
- Scheid CR, Koul H, Hill WA et al. Oxalate ion and calcium oxalate crystal interactions with renal epithelial cells. In: Coe FL, Favus MJ, Pak CYC, Parks JH, Preminger GM, eds. *Kidney Stones: Medical and Surgical Management*. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, 1996; 129-143
- Knoll T, Steidler A, Trojan L et al. The influence of oxalate on renal epithelial and interstitial cells. *Urol Res* 2004; 32 (4): 304-309
- Sarica K, Erbagci A, Yaci F et al. Limitation of apoptotic changes in renal tubular cell injury induced by hyperoxaluria. *Urol Res* 2004; 32 (4): 271-277
- Miyazawa K, Suzuki K, Ikeda R et al. Apoptosis and its related genes in renal epithelial cells of the stone-forming rat. *Urol Res* 2005; 33 (1): 31-38
- Scheid CR, Koul HK, Kennington L et al. Oxalate-induced damage to renal tubular cells. *Scanning Microsc* 1995; 9: 1097-1105
- Selvan R. Calcium oxalate stone disease: role of lipid peroxidation and antioxidants. *Urol Res* 2002; 30 (1): 35-47
- Thamilselvan S, Khan SR, Menon M. Oxalate and calcium oxalate mediated free radical toxicity in renal epithelial cells: effect of antioxidants. *Urol Res* 2003; 31 (1): 3-9
- Rashed T, Menon M, Thamilselvan S. Molecular mechanism of oxalate-induced free radical production and glutathione redox imbalance in renal epithelial cells: effect of antioxidants. *Am J Nephrol* 2004; 24 (5): 557-568
- Khan SR. Hyperoxaluria-induced oxidative stress and antioxidants for renal protection. *Urol Res* 2005; 33 (5): 349-357
- Green ML, Freel RW, Hatch M. Lipid peroxidation is not the underlying cause of renal injury in hyperoxaluric rats. *Kidney Int* 2005; 68: 2629-2638
- Evan AP, Bledsoe SB, Smith SB, Bushinsky DA. Calcium oxalate crystal localization and osteopontin immunostaining in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Kidney Int* 2004; 65 (1): 154-161
- Schepers MS, van Ballegooijen ES, Bangma CH, Verkoelen CF. Crystal cause acute necrotic cell death in renal proximal tubule cells but not in collecting tubule cells. *Kidney Int* 2005; 68 (4): 1543-1553
- Schepers MS, van Ballegooijen ES, Bangma CH, Verkoelen CF. Oxalate is toxic to renal tubular cells only at supraphysiologic concentrations. *Kidney Int* 2005; 68 (4): 1660-1669
- Verkoelen CF, Schepers MS, van Ballegooijen ES, Bangma CH. Effects of luminal oxalate or calcium oxalate on renal tubular cells in culture. *Urol Res* 2005; 33 (5): 321-328
- Verkoelen CF, van der Boom BG, Houtsmuller AB et al. Increased calcium oxalate monohydrate crystal binding to injured renal tubular epithelial cells in culture. *Am J Physiol Renal Physiol* 1998; 274: F958-F965
- Verkoelen CF, Van Der Boom BG, Kok DJ et al. Attachment sites for particles in the urinary tract. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 (14): S430-S435
- Asselman M, Verkoelen CF. Crystal-cell interaction in the pathogenesis of kidney stone disease. *Curr Opin Urol* 2002; 12: 271-276
- Verkoelen CF. Crystal retention in renal stone disease: A crucial role for the glycosaminoglycan hyaluronan? *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1673-1687
- Finlayson B, Reid F. The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. *Invest Urol* 1978; 15: 442-448
- Vermeulen CW, Lyon ES. Mechanisms of genesis and growth of calculi. *Am J Med* 1968; 45: 684-692
- Land TA, De Yoreo JJ. In situ AFM investigation of growth source activity on single crystals of canavalin. *J Cryst Growth* 1999; 208: 623-637
- De Yoreo JJ, Orme CA, Land TA. Using atomic force microscopy to investigate solution crystal growth. In: Sato K, Nakajima K, Furukawa Y, eds. *Advances in Crystal Growth Research*. Elsevier, Amsterdam, 2000; 361-380
- Lieske JC, Toback GF, Deganello S. Sialic acid-containing glycoproteins on renal cells determine nucleation of calcium oxalate dihydrate crystals. *Kidney International* 2001; 60: 1784-1791
- De Yoreo JJ, Velikov P. Principles of crystal nucleation and growth. *Rev Mineral Geochem* 2003; 54: 57-93
- De Yoreo JJ, Qin SR, Hoyer JR. Molecular modulation of calcium oxalate crystallization. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291 (6): F1123-F1132
- Rabinovich YI, Esayanur M, Daosukho S et al. Adhesion force between calcium oxalate monohydrate crystal and kidney epithelial cells and possible relevance for kidney stone formation. *J Colloid Interface Sci* 2006; 300 (1): 131-140
- Rabinovich YI, Daosukho S, Byer KJ et al. Direct AFM measurements of adhesion forces between calcium oxalate monohydrate and kidney epithelial cells in the presence of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions. *J Colloid Interface Sci* 2008; 325 (2): 594-601
- Тиктинский ОЛ, Александров ВП. *Мочекаменная болезнь*. Питер, СПб., 2000; 3-12
- Coe FL, Parks JH, Asplin JR. The pathogenesis and treatment of kidney stones. *N Engl J Med* 1992; 327: 1141-1152
- Lieske JC, Leonard R, Swift H, Toback FG. Adhesion of calcium oxalate monohydrate crystals to anionic sites on the surface of renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 1996; 270: F192-F199
- Melick RA, Quelch KJ, Rhodes M. The demonstration of sialic acid in kidney stone matrix. *Clin Sci (Lond)* 1980; 59 (5): 401-404
- Hofbauer J, Fang-Kircher S, Steiner G et al. N-acetylneuraminic acids (nana): A potential key in renal calculogenesis. *Urol Res* 1998; 26 (1): 49-56

39. Yoshimura K, Yoshioka T, Miyake O et al. Investigation of the possible role of sialic acid in calcium oxalate urolithiasis. *Eur Urol* 1998; 33 (1): 111-115
40. Verkoelen CF, Van Der Boom GB, Kok DJ, Romijn JC. Sialic acid and crystal binding. *Kidney Int* 2000; 57: 1072-1082
41. Lieske JC, Leonard R, Toback FG. Adhesion of calcium oxalate monohydrate crystals to renal epithelial cells is inhibited by specific anions. *Am J Physiol* 1995; 268: F604-F612
42. Mann PL. Membrane oligosaccharides: Structure and function during differentiation. *Int Rev Cytol* 1988; 12: 67-96
43. Newman RA, Delia D: Analysis of the bonding of peanut agglutinin (PNA) to leukaemic cells and its relationship to T-cell differentiation. *Immunology* 1983; 49: 147-153
44. Laitinen L, Lehtonen E, Virtanen I. Differential expression of galactose and N-acetylgalactosamine residues during fetal development and postnatal maturation of rat glomeruli as revealed with lectin conjugates. *Anat Rec* 1989; 223: 311-321
45. Mandel N. Crystal-membrane interaction in kidney stone disease. *J Am Soc Nephrol* 1998; 5: S37-S45
46. Franzen A, Heinegerd D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J* 1985; 232 (3): 715-724
47. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11 (3): 279-303
48. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW et al. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammations, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 2001; 107 (9): 1055-1061
49. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V et al. Osteopontin - A molecule for all seasons. *QJM* 2002; 95 (1): 3-13
50. Hudkins KL, Giachelli CM, Cui Y et al. Osteopontin expression in fetal and mature human kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 444-457
51. Xie Y, Sakatsume M, Nishi S et al. Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney. *Kidney Int* 2001; 60: 1645-1657
52. Shiraga H, Min W, VanDusen WJ et al. Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin: another member of the aspartic acid-rich protein superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 426-430
53. Worcester EM, Beshensky AM. Osteopontin inhibits nucleation of calcium oxalate crystals. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 760: 375-377
54. Hoyer JR, Asplin JR, Otvos L. Phosphorylated osteopontin peptides suppress crystallization by inhibiting the growth of calcium oxalate crystals. *Kidney Intern* 2001; 60: 77-82
55. Gokhale JA, Glenton PA, Khan SR. Localization of Tamm-Horsfall protein and osteopontin in a rat nephrolithiasis model. *Nephron* 1996; 73: 456-461
56. Jiang XJ, Feng T, Chang LS et al. Expression of osteopontin mRNA in normal and stone-forming rat kidney. *Urol Res* 1998; 26: 389-394
57. Khan SR, Johnson JM, Peck AB et al. Expression of osteopontin in rat kidneys: induction during ethylene glycol induced calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol* 2002; 168 (3): 1173-1181
58. Wesson JA, Johnson RJ, Mazzali M et al. Osteopontin Is a Critical Inhibitor of Calcium Oxalate Crystal Formation and Retention in Renal Tubules. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 139-147
59. Yamate T, Kohri K, Umekawa T et al. The effect of osteopontin on the adhesion of calcium oxalate crystals to Madin-Darby canine kidney cells. *Eur Urol* 1996; 30 (3): 388-393
60. Yamate T, Kohri K, Umekawa T et al. Osteopontin antisense oligonucleotide inhibits adhesion of calcium oxalate crystals in Madin-Darby canine kidney cell. *J Urol* 1998; 160 (4): 1506-1512
61. Yamate T, Kohri K, Umekawa T et al. Interaction between osteopontin on madin darby canine kidney cell membrane and calcium oxalate crystal. *Urol Int* 1999; 62 (2): 81-86
62. Yasui T, Fujita K, Asai K, Kohri K. Osteopontin regulates adhesion of calcium oxalate crystals to renal epithelial cells. *Int J Urol* 2002; 9 (2): 100-108
63. Konya E, Umekawa T, Iguchi M, Kurita T. The role of osteopontin on calcium oxalate crystal formation. *Eur Urol* 2003; 43 (5): 564-571
64. Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N, Termine JD. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J Biol Chem* 1987; 262: 9702-9708
65. Prince CW, Oosawa T, Bulter WT et al. Isolation, characterization, and biosynthesis of phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J Biol Chem* 1987; 262: 2900-2907
66. Singh K, DeVouge MW, Mukherjee BB. Physiological properties and differential glycosylation of phosphorylated and nonphosphorylated forms of osteopontin secreted by normal rat kidney cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 18696-18701
67. Kasugai S, Todescan R, Nagata T et al. Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype. *J Cell Physiol* 1991; 147: 111-120
68. Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins; structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J* 1994; 300: 723-728
69. Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M et al. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol Chem* 1994; 269 (21): 14853-14856
70. Katayama Y, House CM, Udagawa N et al. Casein kinase 2 phosphorylation of recombinant rat osteopontin enhances adhesion of osteoclasts but not osteoblasts. *J Cell Physiol* 1998; 176 (1): 179-187
71. Razzouk S, Brunn JC, Qin C et al. Osteopontin posttranslational modifications, possibly phosphorylation, are required for in vitro bone resorption but not osteoclast adhesion. *Bone* 2002; 30 (1): 40-47
72. Gericke A, Qin C, Spevak L et al. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int* 2005; 77 (1): 45-54
73. Christensen B, Kazanekki CC, Petersen TE et al. Cell type-specific post-translational modifications of mouse osteopontin are associated with different adhesive properties. *J Biol Chem* 2007; 282 (27): 19463-19472
74. Asselman M, Verhulst A, De Broe ME, Verkoelen CF. Calcium oxalate crystal adherence to hyaluronan-, osteopontin, and CD44-expressing injured/regenerating tubular epithelial cells in rat kidneys. *J Am Soc Nephrol* 14 : 3155-3166, 2003
75. Pure E, Cuff CA. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol Med* 2001; 7: 213-221
76. Verhulst A, Asselman M, Persy VP et al. Crystal retention capacity of cells in the human nephron: Involvement of CD44 and its ligands hyaluronic acid and osteopontin in the transition of a crystal binding into a nonadherent epithelium. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 107-115
77. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M et al. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61: 1303-1313
78. Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 1996; 271: 509-512
79. Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem* 2002; 277 (7): 4589-4592
80. Khan SR, Shevock PN, Hackett RL. Presence of lipids in urinary stones: Results of preliminary studies. *Calcif Tissue Int* 1988; 42: 91-96
81. Khan SR, Shevock P, Hackett RL. In vitro precipitation of calcium oxalate in the presence of whole matrix or lipid components of the urinary stones. *J Urol* 1988; 139: 418-422
82. Khan SR, Maslamani SA, Atmani F et al. Membranes and their constituents as promoters of calcium oxalate crystal formation in human urine. *Calcif Tissue Int* 2000; 66 (2): 90-96
83. Khan SR, Glenton PA, Backov R, Talham DR. Presence

- of lipids in urine, crystals and stones: implications for the formation of kidney stones. *Kidney Int* 2002; 62:2062-2072
84. Khan SR, Kok DJ. Modulators of urinary stone formation. *Front Biosci* 2004; 9: 1450-1482
85. Bigelow MW, Wiessner JH, Kleinman JG, Mandel NS. Calcium oxalate-crystal membrane interactions: Dependence on membrane lipid composition. *J Urol* 1996; 155: 1094-1098
86. Bigelow MW, Wiessner JH, Kleinman JG, Mandel NS. Surface exposure of phosphatidylserine increases calcium oxalate crystal attachment to IMCD cells. *Am J Physiol* 1997; 272 (1 Pt 2): F55-62
87. Cao LC, Jonassen J, Honeyman TW, Scheid C. Oxalate-induced redistribution of phosphatidylserine in renal epithelial cells: implications for kidney stone disease. *Am J Nephrol* 2001; 21: 69-77
88. Wiessner JH, Hasegawa AT, Hung LY, Mandel NS. Oxalate-induced exposure of phosphatidylserine on the surface of renal epithelial cells in culture. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 (14): S441-445
89. Thiagarajan P, Tait JF. Collagen-induced exposure of anionic phospholipids in platelets and platelet-derived microparticles. *J Biol Chem* 1991; 266: 24302-24307
90. Князькин ИВ, Цыган ВН. *Апоптоз в онкоурологии*. Наука, СПб., 2007; 54-55
91. Savil J. Apoptosis and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 12-21
92. Wiessner JH, Hasegawa AT, Hung LY et al. Mechanisms of calcium oxalate crystal attachment to injured renal collecting duct cells. *Kidney Int* 2001; 59: 637-644
93. Leiser J, Molitoris BA. Disease processes in epithelia: The role of the actin cytoskeleton and altered surface membrane polarity. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1225: 1-13
94. Fish EM, Molitoris BA. Alterations in epithelial polarity and the pathogenesis of disease states. *N Engl J Med* 1994; 330: 1580-1588
95. Riese RJ, Mandel NS, Wiessner JW et al. Cell polarity and calcium oxalate crystal adherence to cultured collecting duct cells. *Am J Physiol* 1992; 262: F177-F184
96. Sorokina EA, Kleinman JG. Cloning and preliminary characterization of a calcium-binding protein closely related to nucleolin on the apical surface of inner medullary collecting duct cells. *J Biol Chem* 1999; 274 (39): 27491-27496
97. Semenkovich CF, Ostlund RE Jr, Olson MO, Yang JW. A protein partially expressed on the surface of HepG2 cells that binds lipoproteins specifically is nucleolin. *Biochemistry* 1990; 29 (41): 9708-9713
98. Jordan P, Heid H, Kinzel V, Kubler D. Major cell surface-located protein substrates of an ecto-protein kinase are homologs of known nuclear proteins. *Biochemistry* 1994; 33 (49): 14696-14706
99. Krantz S, Salazar R, Brandt R et al. Purification and partial amino acid sequencing of a fructosyllysine-specific binding protein from cell membranes of the monocyte-like cell line U937. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1266 (1): 109-112
100. de Verdugo UR, Selinka HC, Huber M et al. Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotypes of coxsackie B viruses. *J Virol* 1995; 69 (11): 6751-6757
101. Xie J, Briggs JA, Olson MO et al. Human myeloid cell nuclear differentiation antigen binds specifically to nucleolin. *J Cell Biochem* 1995; 59 (4): 529-536
102. Take M, Tsutsui J, Obama H et al. Identification of nucleolin as a binding protein for midkine (MK) and heparin-binding growth associated molecule (HB-GAM). *J Biochem* 1994; 116 (5): 1063-1068
103. Hovanessian AG, Puvion-Dutilleul F, Nisole S et al. The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* 2000; 261: 312-328
104. Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 1989; 56 (3): 379-390
105. Schmidt-Zachmann MS, Dargemont C, Kohn LC, Nigg EA. Nuclear export of proteins: the role of nuclear retention. *Cell* 1993; 74 (3): 493-504
106. Nigg EA. Nucleocytoplasmic transport: Signals, mechanisms and regulation. *Nature* 1997; 386: 779-787
107. Kleinman HK, Weeks BS, Cannon FB et al. Identification of a 110-kDa nonintegrin cell surface laminin-binding protein which recognizes an A chain neurite-promoting peptide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 290: 320-325
108. Kibbey MC, Johnson B, Petryshyn R et al. A 110-kD nuclear shuttling protein, nucleolin, binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin-1. *J Neurosci Res* 1995; 42: 314-322
109. Sorokina EA, Wesson JA, Kleinman JG. An acidic peptide sequence of nucleolin-related protein can mediate the attachment of calcium oxalate to renal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2057-2065
110. Kumar V, Farell G, Deganello S, Lieske JC. Annexin II is present on renal epithelial cells and binds calcium oxalate monohydrate crystals. *Am Soc Nephrol* 2003; 14: 289-297
111. Gerke V, Moss SE. Annexins: From structure to function. *Physiol Rev* 2002; 82: 331-371
112. Siever DA, Erickson HP. Extracellular annexin II. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 1219-1223
113. Ma AS, Ozers LJ. Annexins I and II show differences in subcellular localization and differentiation-related changes in human epidermal keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 596-603
114. Hajjar KA, Guevara CA, Lev E et al. Interaction of the fibrinolytic receptor, annexin II, with the endothelial cell surface. Essential role of endonexin repeat 2. *J Biol Chem* 1996; 271: 21652-21659
115. Raynor CM, Wright JF, Waisman DM, Prydzial EL. Annexin II enhances cytomegalovirus binding and fusion to phospholipid membranes. *Biochemistry* 1999; 38: 5089-5095
116. Baran DT, Quail JM, Ray R et al. Annexin II is the membrane receptor that mediates the rapid actions of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$. *J Cell Biochem* 2000; 78: 34-46
117. Carr G, Simmons NL, Sayer JA. Disruption of clc-5 leads to a redistribution of annexin A2 and promotes calcium crystal agglomeration in collecting duct epithelial cells. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 367-377
118. Chiang Y, Schneiderman MH, Vishwanatha JK. Annexin II expression is regulated during mammalian cell cycle. *Cancer Res* 1993; 53: 6017-6021
119. Lieske JC, Spargo BH, Toback FG. Endocytosis of calcium oxalate crystals and proliferation of renal tubular epithelial cells in a patient with type 1 primary hyperoxaluria. *J Urol* 1992; 148: 1517-1519
120. Lieske JC, Swift H, Martin T et al. Renal epithelial cells rapidly bind and internalize calcium oxalate monohydrate crystals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6987-6991
121. Lieske JC, Toback FG. Regulation of renal epithelial cell endocytosis of calcium oxalate monohydrate crystals. *Am J Physiol* 1993; 264: F800-F807
122. Lieske JC, Walsh-Reitz MM, Toback FG. Calcium oxalate monohydrate crystals are endocytosed by renal epithelial cells and induce proliferation. *Am J Physiol* 1992; 262: F622-F630
123. Hammes MS, Lieske JC, Pawar S et al. Calcium oxalate monohydrate crystals stimulate gene expression in renal epithelial cells. *Kidney Int* 1995; 48: 501-509
124. Lieske JC, Hammes MS, Hoyer JR, Toback FG. Renal cell osteopontin production is stimulated by calcium oxalate monohydrate crystals. *Kidney Int* 1997; 51: 679-686
125. Scheiffele P, Verkade P, Fra AM et al. Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. *J Cell Biol* 1998; 140: 795-806
126. Carozzi AJ, Ikonen E, Lindsay MR, Parton RG. Role of cholesterol in developing T-tubules: analogous mechanisms for T-tubule and caveolae biogenesis. *Traffic* 2000; 1: 326-341
127. Verkoelen CF, van der Boom BG, Romijn JC. Identification of hyaluronan as a crystal-binding molecule at the surface of migrating and proliferating MDCK cells. *Kidney Int* 2000; 58: 1045-1054
128. Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *J Intern Med* 1997; 242: 35-40

129. Lee JY, Spicer AP. Hyaluronan: A multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 581–586
130. Toole BP. Hyaluronan is not just a goo! *J Clin Invest* 2000; 106: 335–336
131. Stern R. Hyaluronan catabolism: A new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol* 2004; 83: 317–325
132. Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem* 1997; 272: 13997–14000
133. Laurent TC, Lilja K, Brunberg L et al. Urinary excretion of hyaluronan in man. *Scand J Clin Lab Invest* 1987; 47: 793–799
134. Sun L, Feusi E, Sibalic A et al. Expression profile of hyaluronidase mRNA transcripts in the kidney and in renal cells. *Kidney Blood Press* 1998; 21: 413–418
135. Knudson W, Chow G, Knudson CB. CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biol* 2002; 21: 15–23
136. Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T et al. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest* 2000; 106: 349–360
137. Belsky E, Toole BP. Hyaluronate and hyaluronidase in the developing chick embryo kidney. *Cell Differ* 1983; 12: 61–66
138. Asselman M, Verhulst A, Van Ballegooijen ES, Bangma CH et al. Hyaluronan is apically secreted and expressed by proliferating or regenerating renal tubular cells. *Kidney Int* 2005; 68: 71–83
139. Кабилова НО. Влияние вазопрессина, dDAVP и AVP-A на экспрессию генов гиалуронан-синтазы 2 и гиалуронидазы 1 и 2 в почке крыс Вистар и Браттлборо с наследственным дефектом синтеза вазопрессина. В: Тез докл VI Сибирск физиол. съезда. Принтэкспресс, Барнаул, 2008; 2: 130
140. Ginetzinsky AG. Role of hyaluronidase in the reabsorption of water in renal tubules: The mechanism of action of the antidiuretic hormone. *Nature* 1958; 182: 1218–1219
141. Ginetzinsky AG. Relationship between urinary hyaluronidase and diuresis. *Nature* 1961; 189: 235–237
142. Иванова ЛН, Кабилова НО, Бондарь АА. Влияние dDAVP, агониста V₂ рецепторов вазопрессина, на экспрессию генов гиалуронидазы 1 и 2 типов в почке крыс Вистар и Браттлборо. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 2007; 93 (5): 494–504
143. Hansell P, Goransson V, Odland C et al. Hyaluronan content in the kidney in different states of body hydration. *Kidney Int* 2000; 58: 2061–2068
144. Ivanova LN, Melidi NN. Effects of vasopressin on hyaluronate hydrolase activities and water permeability in the frog urinary bladder. *Pflugers Arch* 2001; 443: 72–77
145. Law RO, Rowen D. The influence of hyaluronidase on urinary and renal medullary composition following antidiuretic stimulus in the rat. *J Physiol* 1981; 311: 341–354
146. Sibalic V, Fan X, Loffing J, Wuthrich RP. Upregulated renal tubular CD44, hyaluronan, and osteopontin in kdkd mice with interstitial nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 1344–1353
147. Goransson V, Johnsson C, Jacobson A et al. Renal hyaluronan accumulation and hyaluronan synthase expression after ischaemia-reperfusion injury in the rat. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 823–830
148. Lewington AJ, Padanilam BJ, Martin DR, Hammerman MR. Expression of CD44 in kidney after acute ischemic injury in rats. *Am J Physiol Regul Integr* 2000; 278: R247–R254
149. Verhulst A, Asselman M, De Naeyer S et al. Preconditioning of the distal tubular epithelium of the human kidney precedes nephrocalcinosis. *Kidney Int* 2005; 68: 1643–1647
150. Knudson W, Knudson CB. Assembly of a chondrocyte-like pericellular matrix on non-chondrogenic cells. Role of the cell surface hyaluronan receptors in the assembly of a pericellular matrix. *J Cell Sci* 1991; 99: 227–235
151. Schepers MSJ, van der Boom BG, Romijn JC et al. Urinary crystallization inhibitors do not prevent crystal binding. *J Urol* 2002; 167: 1844–1847
152. Evan AP, Lingeman JE, Coe FL et al. Randall's plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle. *J Clin Invest* 2003; 111 (5): 607–616

Поступила в редакцию 20.10.2008 г.

Принята в печать 10.02.2009 г.