

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
РАДИОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

Урусханова  
Жанна Эйсаевна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СОСУДИСТЫХ  
КЛУБОЧКОВ ПОЧКИ ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО ОБЛУЧЕНИЯ  
ЭЛЕКТРОНАМИ И НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

1.5.22. – Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**  
Доктор медицинских наук  
Демяшкин Григорий Александрович

Москва – 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Радиационно-индуцированная нефропатия.....	15
1.2. Особенности влияния различных типов облучения на органы и ткани.....	15
1.3. Электронотерапия: механизмы и воздействие на ткани.....	19
1.4. Воздействие ионизирующего излучения на структуры почки.....	20
1.5. Стратегии защиты здоровых тканей от радиационного повреждения.....	25
1.6. Заключение по обзору литературы.....	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	29
2.1. Дизайн исследования .....	29
2.2. Модель облучения электронами и введение аскорбиновой кислоты.....	30
2.3. Методы исследования.....	34
2.3.1. Иммуноферментный анализ .....	34
2.3.2. Биохимическое исследование.....	35
2.3.3. Гистологическое исследование .....	36
2.3.4. Морфометрическое исследование.....	37
2.3.5. TUNEL исследование .....	38
2.3.6. Иммуногистохимическое исследование.....	39
2.3.7. Статистические методы.....	40
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	41
3.1. Макроскопическое исследование .....	41
3.2. Иммуноферментный анализ.....	43
3.3. Биохимическое исследование .....	45
3.4. Гистологическое исследование .....	50
3.6. Иммуногистохимическое исследование .....	59
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	82
4.1. Воздействие локального облучения электронами на почки.....	82
4.2. Радиопротективное действие аскорбиновой кислоты .....	87
4.3. Итоги выполнения диссертационной работы .....	91

4.4. Перспективы развития темы диссертационной работы .....	92
ВЫВОДЫ.....	93
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	96
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	99

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Радиационно-индуцированная нефропатия (РИН) является одним из осложнений воздействия различных видов ионизирующего излучения на почки, а также при лучевой терапии (ЛТ) злокачественных новообразований органов брюшинного пространства, брюшной полости и таза (Li Y. et al., 2024). С учетом ежегодного прироста онкологических заболеваний (Всемирная организация здравоохранения, 2024) и частоты сопутствующего применения ЛТ необходимость изучения механизмов и последствий РИН становится все более актуальной.

Несмотря на накопленные данные о воздействии на структуры почек и, особенно, сосудистого клубочка, различных видов облучения, таких как гамма- и рентгеновское излучение, влияние корпускулярного облучения, в первую очередь электронов и протонов, изучено недостаточно. Однако наиболее часто используемые в лучевой терапии X- и  $\gamma$ -облучение повышают риск повреждения окружающих здоровых тканей и развития осложнений, прежде всего к фиброзу. (Zhang et al., 2023; Borzouei и Leh S. et al., 2020). В отличие от них, бета-излучение имеет более низкую проникающую способность с минимальным повреждением здоровых тканей, что делает его более перспективным методом лучевой терапии (Tshephe TS. et al., 2022).

Таргетность электронов, как и других видов ИИ, направлена на разрывы ДНК прежде всего опухолевых клеток, а также на активацию эндогенной редокс-системы, путем повышения концентрации свободных радикалов (Klaus R. et al., 2021). При этом наблюдается апоптоз большинства структур почки, прежде всего, эндотелия сосудистых клубочков и нефроцитов. В этих процессах ключевая роль принадлежит активации каспазного каскада.

По-прежнему требуют раскрытия механизмы развития острого лучевого повреждения структур почки – сосудистых клубочков и канальцев нефронов после воздействия электронами, такие как регуляция пролиферации и апоптоза, значение

маркеров редокс-системы и др. В этой связи также актуальны исследования радиопротективных свойств существующих лекарственных препаратов и поиск новых. Действие большинства антиоксидантов (аскорбиновая кислота, N-ацетилцистеин и др.) направлено на снижение степени местной окислительной реакции (Liakopoulos V. et al., 2019), что делает их перспективными для профилактики ранних или поздних радиационно-индуцированных повреждений почки. Из целого ряда лекарственных препаратов с необходимыми свойствами, аскорбиновая кислота, пожалуй, обладает высокой антиоксидантной активностью.

На сегодняшний день, существует определенный дефицит данных о дозависимом эффекте воздействия электронов на структуры почки и активации интратенальных регуляторных механизмов при предлучевом введении аскорбиновой кислотой.

### **Степень разработанности темы исследования**

В современной литературе накоплены определенные данные о радиационно-индуцированных повреждениях структур почки после гамма- и рентгеновского излучения (Муркамилов и др., 2020; Колина и др., 2014): морфофункциональные изменения элементов гломерулярного аппарата и эпителия канальцев нефрона при различных дозах облучения и разных временных сроках. Однако остаются пробелы в понимании молекулярно-биологических и молекулярно-генетических механизмов повреждений после облучения структур почки.

В то же время, в специализированной литературе отсутствуют исследования, посвященные воздействию электронов на эндотелий сосудистого клубочка, нефроциты проксимального и дистального канальцев нефронов как в раннем, так и позднем периоде РИН. Более глубокое изучение этих механизмов с анализом специфических сигнальных путей повреждений на клеточном и молекулярном уровнях, ответственных за регуляцию оксидативного стресса и степени воспалительной реакции поможет в разработке новых терапевтических подходов и радиопротективных агентов.

В условиях поиска более безопасных и эффективных методов радиопротекции аскорбиновая кислота является перспективным средством благодаря своим многообразным механизмам действия.

Введение аскорбиновой кислоты может способствовать восстановлению повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) путем ингибирования образования димеров тимина, а также уменьшать токсичность радиационного воздействия. Несмотря на известные протекторные свойства аскорбиновой кислоты, комплексная оценка ее воздействия на ключевые механизмы радиационного повреждения почек, в условиях модели радиационной нефропатии, индуцированной электронным облучением, до сих пор остается недостаточно изученным.

### **Цель и задачи исследования**

**Цель исследования:** выявление структурно-функциональных изменений в почках, индуцированных электронным облучением, а также определение протективного потенциала аскорбиновой кислоты в условиях экспериментальной радиационной нефропатии.

#### **Задачи исследования:**

1. Провести гистологический анализ структур почки при введении аскорбиновой кислоты в условиях экспериментальной радиационной нефропатии, индуцированной однократным локальным воздействием электронами в дозах 2 Гр и 8 Гр.

2. Изучить динамику концентраций креатинина, азота мочевины, С-реактивного белка и цистатин-С-креатининового соотношения в сыворотке крови при введении аскорбиновой кислоты в условиях экспериментальной радиационной нефропатии, индуцированной однократным локальным воздействием электронами в дозах 2 Гр и 8 Гр.

3. Определить уровни маркеров системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты (SOD, MDA и GSH) в гомогенате почки при введении аскорбиновой кислоты в условиях экспериментальной радиационной нефропатии, индуцированной однократным локальным воздействием электронами в дозах 2 Гр и 8 Гр.

4. Оценить степень экспрессии факторов пролиферации (Ki-67), про- и апоптоза (p53, каспаза 3), TUNEL сигнала в эндотелии сосудистого клубочка почки и эпителии канальцев нефрона при введении аскорбиновой кислоты в условиях экспериментальной радиационной нефропатии, индуцированной однократным локальным воздействием электронами в дозах 2 Гр и 8 Гр.

5. Определить концентрации провоспалительных (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов в сыворотке крови и структурах почки при введении аскорбиновой кислоты в условиях экспериментальной радиационной нефропатии, индуцированной однократным локальным воздействием электронами в дозах 2 Гр и 8 Гр.

6. Оценить выраженность фиброзных изменений (разрастания волокнистого компонента) в структурах почки при введении аскорбиновой кислоты в условиях экспериментальной радиационной нефропатии, индуцированной однократным локальным воздействием электронами в дозах 2 Гр и 8 Гр.

### **Научная новизна**

Впервые, при комплексном исследовании структур почки после воздействия электронами в разовых очаговых дозах (РОД) 2 Гр и 8 Гр, выявлены признаки радиационно-индуцированной нефропатии: уменьшение количества клубочков, дистрофические изменения и частичная атрофия отдельных канальцев нефрона; уменьшение количества Ki-67-позитивных клеток клубочков и эпителиоцитов проксимального и дистального канальцев на фоне увеличения в этих клетках маркера терминальной стадии апоптоза – каспаза-3 и TUNEL сигналинга; клеточная воспалительная инфильтрация интерстициальной ткани. Обнаруженные

изменения были более выражены при РОД 8 Гр, а также присоединяется разрастание волокнистого компонента. Кроме того, наблюдается увеличение количества провоспалительных (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) и, компенсаторное, противовоспалительных (IL-10, IL-4) цитокинов в сыворотке крови и структурах почки, а также увеличение концентрации креатинина, азота мочевины, С-реактивного белка и цистатин-С-креатининового соотношения, особенно в РОД 8 Гр. При анализе гомогената почки после однократного локального облучения электронами в дозах 2 Гр и 8 Гр обнаружено повышение концентрации малонового диальдегида и понижение уровня супероксиддисмутазы и глутатиона. Определена наиболее безопасная доза – РОД 2 Гр.

Впервые установлено, что аскорбиновая кислота оказывает выраженное протективное действие, способствуя поддержанию физиологического тканевого гомеостаза почки в условиях экспериментальной радиационной нефропатии, индуцированной однократным локальным воздействием электронами в дозах 2 Гр и 8 Гр. Ее эффект проявляется в активацией маркеров системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной эндогенной системы, снижении степени повреждения структур почки, модуляции биохимических показателей клубочковой фильтрации, нормализации пролиферативно-апоптотического баланса за счет уменьшения повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты, а также в ослаблении системного и локального воспаления.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость настоящего исследования заключается в раскрытии механизмов молекулярного и клеточного повреждения и адаптивного ответа ткани почки на уровне морфологических и молекулярно-биологических изменений, а также в идентификации специфических биохимических маркеров в условиях экспериментальной радиационной нефропатии, индуцированной однократным локальным воздействием электронами в дозах 2 Гр и 8 Гр, а также при введении аскорбиновой кислоты.

Воздействие электронами также приводит к разрывам ДНК в эндотелии клубочка почки и эпителии проксимальных и дистальных канальцев нефрона, что показано TUNEL методом и указывает на появление гипоксии в условиях радиационно-индуцированной нефропатии. Полученные TUNEL методом результаты могут быть полезны для разработки стратегии профилактики, оценки эффективности лечения и прогнозирования лучевых осложнений. Использование TUNEL метода в экспериментальных исследованиях позволяет анализировать молекулярные механизмы, лежащие в основе гипоксии, возникающие в результате РИН, а также выявлять потенциальные мишени для фармакологического применения различных лекарственных препаратов, прежде всего протекторов. Однократное воздействие электронами, даже при локальном облучении приводит к увеличению в системном кровотоке провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ ), а также активации компенсаторно-приспособительных реакций, в том числе повышению концентраций противовоспалительных ИЛ-10 и ИЛ-4 цитокинов.

Комплексный анализ данных, полученных методами биохимического, гистологического, иммуногистохимического и иммуноферментного исследований, позволил установить, что введение аскорбиновой кислоты инициирует компенсаторно-приспособительные реакции в условиях РИН: активирует элементы локальной эндогенной редокс-системы, поддерживает уровень пролиферации эндотелия клубочков и эпителия почечных канальцев, уменьшают степень экспрессии провоспалительных цитокинов и фиброгенеза. Таким образом, учитывая, что аскорбиновая кислота участвует в механизмах интраклеточной регуляции гомеостаза, не исключено ее выраженное протекторное действие, направленное прежде всего на активацию компонентов локальной редокс-системы (за счет наличия множества гидроксильных групп) и на репарацию ДНК, что подтверждено TUNEL методом.

Практическая значимость работы заключается в расширении фундаментальных представлений о клеточных и тканевых реакциях почки на однократное локальное воздействие электронными частицами в дозах 2 Гр и 8 Гр,

а также о модифицирующем влиянии предварительного интраперитонеального введения аскорбиновой кислоты. Полученные результаты могут служить основой для оптимизации режимов лучевой терапии, а также для углубленного изучения патогенеза радиационных поражений почки в рамках клеточной биологии, патологической анатомии, радиобиологии и онкоурологии. Данные исследования способствуют разработке инновационных подходов к профилактике и коррекции постлучевых осложнений после электронотерапии почки и органов брюшной полости, забрюшинного пространства и малого таза. Кроме того, выводы диссертации могут быть интегрированы в клинические рекомендации для специалистов в области патологической анатомии, радиологии, радиобиологии, онкологии и других смежных медицинских дисциплин.

Диссертационная работа решает **актуальную научную задачу** – выявлены морфофункциональные изменения клубочков и канальцев почки при радиационно-индуцированной нефропатии, вызванной однократным локальным облучением электронами в дозах 2 Гр и 8 Гр, установлены дозависимые эффекты; раскрыты интратрениальные регуляторные механизмы поддержания локального гомеостаза, а также при предлучевом введении аскорбиновой кислотой.

### **Методология и методы исследования**

На этапе планирования был проведен углубленный анализ специализированной научной литературы.

Экспериментальная часть диссертационной работы выполнена на самцах крыс линии Вистар (вес  $220 \pm 20$  грамм; возраст 9 – 10 недель;  $n=90$ ) с использованием комплексного подхода, включающего: иммуноферментный анализ, биохимические методы, морфологическое исследование, иммуногистохимический и морфометрический анализ, а также молекулярно-генетические и общелабораторные методики. Полученные данные были подвергнуты комплексной статистической обработке.

## Положения, выносимые на защиту

1. Локальное воздействие электронами (однократно, разовая очаговая доза 2 Гр и 8 Гр) инициирует развитие радиационно-индуцированной нефропатии, характеризующейся морфологическими (прежде всего – уменьшение количества клубочков, дистрофия эпителия канальцев нефрона, воспалительная реакция, разрастание волокнистого компонента), и функциональными (увеличение ключевых маркеров клубочковой фильтрации, оксидативный стресс) изменениями, особенно в высокой дозе. Аскорбиновая кислота инициирует компенсаторно-приспособительные реакции в ответ на облучение почки электронами, стимулируя компоненты локальной эндогенной редокс-системы (нейтрализуя свободные радикалы), являясь одним из сильнейших восстановителей, что связано с её способностью взаимодействовать с молекулярным кислородом и образовывать активные его формы, снижая степень выраженности лучевого поражения.

2. При однократном воздействии электронами РОД 2 Гр и РОД 8 Гр, способствует активации терминальной стадии апоптоза и усилению TUNEL сигнала в эндотелиоцитах клубочков и эпителии проксимальных и дистальных канальцев нефронов. Аскорбиновая кислота демонстрирует репаративные свойства, направленные на поддержание пула указанных клеточных структур почки, путем минимизации фрагментации ДНК, стабилизируя пролиферативно-апоптотический баланс.

3. Однократное локальное воздействие электронами РОД 2 Гр и РОД 8 Гр приводит к усилению воспалительной реакции. Аскорбиновая кислота играет важную роль в модуляции воспалительных процессов благодаря своим, в том числе – антиоксидантным свойствам и способности регулировать уровень цитокинов; возможно, влияя на иммунокомпетентные клетки.

### **Личный вклад**

Диссертант проанализировала специализированную литературу, сформулировала гипотезы, разработала дизайн и методику. Затем лично выполнял гистологическое, морфометрическое, иммуногистохимическое исследования, иммуноферментный анализ, проводил статистический анализ полученных результатов. В соавторстве подготовлены и опубликованы научные статьи, отражающие ключевые аспекты диссертационной работы.

### **Внедрение результатов диссертации в практику**

Результаты диссертационного исследования внедрены в лечебную работу федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Акт внедрения новой технологии б/н от 11.09.2024 г. Полученные в ходе исследования результаты внедрены в учебный процесс Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины, читаемой аспирантам по направлению подготовки / научной специальности 1.5.22. Клеточная биология. Акт о внедрении №497 от 11.09.2024 г.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень обоснованности результатов обеспечена достаточным объемом репрезентативного материала. В работе применены современные методы статистического анализа. На основании разработанных критериев включения и исключения сформированы группы с однородной выборкой из животных – самцов крыс аутбредного стока породы Вистар (вес  $220 \pm 20$  грамм; возраст 9 – 10 недель;  $n=90$ ).

В работе использовался комплексный подход к статистическому анализу: для всех количественных данных проводилась проверка на нормальность. При нормальном распределении вычислялось групповое среднее арифметическое (M) и стандартная ошибка (SE) / стандартное отклонение (SD) с использованием пакета анализа данных программы Microsoft Excel (версия 14.0.4760.1000, 32-разрядная). Полученные в результате подсчёта данные иммуногистохимического и морфометрического исследований обрабатывались с использованием компьютерной программы SPSS 12 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США). Парные сравнения проведены при помощи U-теста Манна-Уитни. Статистически значимыми считались результаты при  $p < 0,05$ .

Основные результаты диссертационного исследования были доложены и всесторонне обсуждены на VII Международном форуме онкологии и радиотерапии «Ради жизни» (г. Москва, 2024 г.) и Международной онлайн-конференции «Научный диалог: естественные науки» (г. Чебоксары, 2024 г.).

Апробация работы состоялась 05 ноября 2024 (протокол №12) на заседании совместной конференции Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России и ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация на тему «Структурно-функциональные изменения почки после локального облучения электронами и предлучевом введении аскорбиновой кислоты» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук соответствует шифру специальности 1.5.22. Клеточная биология. Области исследования диссертационной работы соответствуют пунктам: 10, 13, 14 паспорта научной специальности 1.5.22. Клеточная биология: пункту 10. Изучение закономерностей цито- и гистогенеза, клеточной дифференцировки, физиологической и репаративной регенерации тканей, а также, регуляции этих процессов; пункту 13. Изучение молекулярных, иммунологических, цитохимических и физиологических

аспектов жизненного цикла клеток при экспериментальных (в том числе повреждающих) воздействиях. Изучение пролиферации клеток, старения и клеточной гибели; пункту 14. Исследование адаптации клеток и тканей к действию различных факторов внешней среды.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационное исследование включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, а также библиографический список, содержащий 131 источник (22 отечественных и 109 зарубежных). Материалы работы представлены на 112 страницах машинописного текста и содержат 51 микрофотографических иллюстраций, а также 6 таблиц, что обеспечивает наглядность и детальное представление экспериментальных данных.

### **Публикации**

Материалы диссертации достаточно полно изложены в 4 опубликованных работах автора, из них 3 – в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, из них 1 научная статья в издании из базы данных RSCI, и 2 статьи в журналах, индексируемых Scopus.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Радиационно-индуцированная нефропатия

Радиационно-индуцированная нефропатия (РИН) по-прежнему остается серьезным осложнением, возникающим при лучевой терапии злокачественных новообразований почки эпителиального или мезенхимального генеза. Некоторые эпидемиологические данные и графики строят прогноз, что к 2050 году количество новых случаев рака почки может быть обнаружено уже у 35 000 000 человек (ВОЗ, 2024) (Трофимова О.П., Ткачев С.И., Юрьева Т.В., 2013).

Ключевой проблемой современной радиобиологии и радиотерапии, а также морфологии является подбор таких видов или способов облучения, выбор доз которые практически не оказывали негативного влияния на окружающие ткани или оно было максимально снижено. В этом направлении хорошо показало себя электронотерапия.

С другой стороны, по-прежнему актуальным остается применение различных оксидантов – как хорошо изученных в роли радиопротекторов, так и новых лекарственных и растительных препаратов.

Сочетание применения различных антиоксидантов при использовании электронотерапии является многообещающим в современной радиологии так как еще больше усилит позицию онкологов и радиотерапевтов при назначении доз и режимов.

### 1.2. Особенности влияния различных типов облучения на органы и ткани

Обнаружение и описание рентгеновских лучей в 1895 году Вильгельмом Рентгеном открыло новую эру в медицине, позволив использовать ионизирующее излучение для лечения ЗНО. Мари Кюри, получившая Нобелевскую премию за свои исследования радия, заложила основу современной радиотерапии, превратив ее в важнейшую ступень в онкологии. Сегодня радиотерапия является признанным

медицинским направлением, в рамках которого работают специалисты различных дисциплин, включая радиационных онкологов, медицинских физиков, медицинских дозиметристов и радиотерапевтов, что позволяет обеспечивать высокоточное планирование и проведение облучения.

Радиационная терапия применяется в различных клинических сценариях и может использоваться как самостоятельный метод или в сочетании с хирургическим вмешательством, химиотерапией, молекулярно-таргетной терапией, иммунотерапией и др. В зависимости от типа, локализации и стадии рака, методы радиотерапии включают традиционное облучение, при котором дозы излучения подаются с помощью специальных аппаратов, которые способны направлять высокоэнергетические пучки излучения (рентгеновские лучи, гамма-лучи, электроны или тяжелые частицы), а также брахитерапию, подразумевающую введение радиоактивных источников непосредственно в опухоль или рядом с ней (Upadhyay R, Bazan JG, 2023; Lukens JN, Gamez M, Hu K, Harrison LB, 2014). Подобные комбинации способствуют радиосенсибилизации опухоли, что позволяет улучшить эффективность лечения и снизить нагрузку на здоровые ткани. Хотя различные виды облучения играют ключевую роль в лечении многих ЗНО, научные исследования убедительно показывают, что воздействие ионизирующего излучения на организм приводит к комплексным нарушениям на всех уровнях его биологической структуры.

Воздействие ионизирующего излучения приводит к выраженным изменениям в молекулярной структуре клеток, в особенности нарушая целостность дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), что инициирует каскад её структурных трансформаций и повреждений. Радиация приводит к формированию одно- и двухцепочечных разрывов в молекуле ДНК. Они могут быть как репарируемыми (обратимыми), так и нерепарируемыми (необратимыми) (Wang C, Lees-Miller SP, 2013; Аклеев А.В., Пушкарев С.А., 2008). Двухцепочечные разрывы (Double Strand Breaks, DSBs) представляют собой наибольшую угрозу, так как они могут вызывать потерю генетической информации, хромосомные aberrации и, в конечном итоге, клеточную гибель через различные универсальные пути апоптоза или некроза. Эти

повреждения активируют сложную систему клеточного ответа на повреждение ДНК (DNA Damage Response, DDR). При этом основную регуляторную функцию в этом процессе выполняют белки ATM (серин/треониновая протеинкиназа, Ataxia-Telangiectasia Mutated), ATR (серин/треониновая протеинкиназа, Ataxia Telangiectasia and Rad3-related) и DNA-РКcs (каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы, DNA-dependent Protein Kinase Catalytic Subunit) (Blackford AN, Jackson SP, 2017). Указанные белки осуществляют координацию механизмов восстановления повреждений ДНК посредством негомологичного соединения концов (Non-Homologous End Joining, NHEJ) и гомологичной рекомбинации (Homologous Recombination, HR), а также задержку клеточного цикла и апоптоз, адаптируя клетку к повреждениям и предотвращая их накопление (Enriquez-Rios V, Dumitrache LC, Downing SM, et al., 2017; Tsai CJ, Chu G, 2013).

Однако не только прямые взаимодействия заряженных частиц с молекулой ДНК определяют уровень повреждений. Существенную роль в разрушении клеточных компонентов играют и косвенные эффекты облучения, связанные с радиолизом воды и других биомолекул, что приводит к образованию реактивных форм кислорода (РФК) и других свободных радикалов (Корякин С. и др., 2024), а также нарушение со стороны редокс-системы (Аникин Д.А. и др., 2022; Napolitano G. et al., 2021; Mikhed Y. et al., 2015; Sundar I.K. et al., 2010; Jarmuszkiewicz W. et al., 2006; Anipsitakis G.P. et al., 2004; Han D. et al., 2001).

Постоянное воздействие РФК и РФА на клеточном уровне инициирует серию цепных реакций, ведущих к изменению структуры и функции биомолекул. В дополнение к разрушению ДНК РФК могут индуцировать окисление тиоловых групп в белках, что приводит к образованию дисульфидных связей и модификации их структуры и функции (Fass D., Thorpe C., 2018; Белоногов Р.Н. и др., 2009). Например, реактивные тиольные группы цистеинов и метионинов в белках быстро реагируют с  $H_2O_2$  и  $NO$ , образуя S-гидроксилированные (S-OH) и S-нитрозилированные (S-NO) производные, что может нарушить их функцию и инициировать новые сигнальные пути клетки (Hess D.T. et al., 2005). Эти окислительные модификации могут изменить локализацию белков, их

взаимодействия и способность к последующим посттрансляционным модификациям, таким как фосфорилирование, что делает цистеиновые остатки основными молекулярными переключателями в трансдукции редокс-сигнала.

Окислительный стресс, вызванный накоплением реактивных форм кислорода, играет центральную роль в активации сигнальных путей, связанных с клеточным стрессом и воспалением. При воздействии радиации избыточное образование РФК запускает активацию транскрипционных факторов, таких как p53 и NF- $\kappa$ B, которые являются ключевыми регуляторами процессов воспаления, апоптоза и клеточного старения (Ильина И.Ю. и др., 2021; Singh V. et al., 2015).

Известно, что NF- $\kappa$ B способно высвобождению цитокинов, прежде всего провоспалительных. Это не только усиливает локальную или системную воспалительную реакцию но и активирует фагоцитоз. При этом высвобождение оксида азота и других соединений приводит к повышенной проницаемости стенки кровеносных сосудов. Поэтому, особенно в условии облучения, иммунные клетки активно мигрируют в зону повреждения → усиление оксидативного стресса → усиление воспаления (всех фаз) (Klaus R. et al., 2021; Hoesel B, Schmid J.A., 2013; Kvietys P.R. et al., 2012; Козловский В.И. и др., 2005; Hou FF et al., 2000).

В данном процессе также активируются или модулируют практически все ключевые сигнальные пути. Например, PI3K/AKT или MAPK/ERK или AMPK. А это и пролиферативный и апоптотический дисбаланс. Потом возникает не только усиление фаз воспаления, но и возможна хронизация процесса, фиброзирование ткани (Su Y.C. et al., 2022; He Y. et al., 2021; Зенков Н.К. и др., 2019; Sun Y. et al., 2015; Chang F et al., 2003).

При локальной воспалительной реакции лидирующая роль принадлежит в том числе маркерам естественной антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазе (SOD), каталазе (CAT) и глутатионпероксидазе (GPX), которые при ионизирующем излучении просто «не справляются» с действием повреждающего фактора. Это также способствует усилению как NF- $\kappa$ B, так и описанных выше сигнальных путей (Ighodaro O. et al., 2018; Hellweg C.E. et al., 2018; Tsai C.S. et al., 2007; Ritter S. et al., 1994).

На основании вышеизложенного, ИИ приводит к активации множества факторов и, тем самым, бесспорно оказывает существенное влияние на тканевой гомеостаз, молекулярно-биологический и молекулярно-генетический профиль. Однако, что важно для радиотерапевтов, степень этих повреждений (от дистрофии до апоптоза и некроза) зависит от вида облучения, режима (однократно или фракционно) и дозы.

Именно поэтому сложные молекулярно-клеточные и молекулярно-биологические и молекулярно-генетические механизмы, индуцируемые облучением, требуют пристального внимания исследователей, открывая перед современными специалистами в области радиотерапии важнейшие задачи – оптимизацию лучевой нагрузки, точное планирование времени и дозировки облучения.

### **1.3. Электронотерапия: механизмы и воздействие на ткани**

Использование электронного облучения (Electron Beam Radiotherapy, EBRT) представляет собой прогрессивный метод в области радиотерапии благодаря своим уникальным физическим характеристикам. Электроны, как заряженные частицы с массой, обладают ограниченной проникающей способностью по сравнению с фотонным (X- и  $\gamma$ -) излучением. В отличие от фотонного излучения, электроны быстро теряют свою энергию при взаимодействии с атомами клеточных молекул, что ведет к быстрому снижению их кинетической энергии и, в конечном итоге, к остановке на определенной глубине, что предоставляет возможность более контролируемого распределения дозы облучения (Ferreira da Silva F., 2022; Kim YJ et al., 2023). Глубина проникновения электронов обычно варьируется от 2 до 3 см в зависимости от их энергии; например, электроны с энергией 6 МэВ достигают глубины около 2,5 см в мягких тканях (Laughlin J., 1965).

В основном облучение электронами используют при лучевой терапии поверхностных злокачественных опухолей, где электронотерапия продемонстрировала свою высокую эффективность (Knoll I. et al., 2022; Kokurewicz K et al., 2021; Entezari K. et al., 2021; Delaney T., 2018; Fuchs T. et al., 2009).

#### **1.4. Воздействие ионизирующего излучения на структуры почки**

Почка выполняет пожалуй самую главную функцию в организме это выведение продуктов обмена из организма путем фильтрации больших объемов циркулирующей крови. Она состоит из коркового и мозгового вещества; структурно-функциональной единицей является – нефрон. Однако в клиническом аспекте наибольшее значение принадлежит клубочку (Кафаров и др., 2022; Buffi et al., 2018). По отношению к облучению, почка обладает высокой радиочувствительностью.

К радиационно-индуцированной нефропатии (РИН) может привести как непосредственное облучение самой почки или ЗНО соседних органов или в трансплантологии (Bertoni et al., 2023; Kerr et al., 2022; Menda et al., 2018). При этом в структурах почки происходят классические изменения описанные выше, связанные с воспалительной реакцией, маркеров редокс-системы и активацией сигнальных путей (Kruijff et al., 2019).

Из клинических признаков РИН можно выделить в первую очередь поражение сосудистого компонента – гломерулосклероз, а также – тубулоинтерстициальный фиброз и почечная недостаточность. При этом эти процессы могут быть как острого, так хронического характера (Gluba-Brzózka et al., 2022; Klaus et al., 2021; Ferlay et al., 2015; Glatstein et al., 1977).

Острая радиационно-индуцированная нефропатия (ОРИН) представляет собой повреждение структур почки, развивающееся в течение нескольких месяцев после воздействия ИИ, особенно у пациентов, подвергшихся тотальному облучению тела или высокодозной радиотерапии в области брюшины и

интерстициального пространства (Bertoni et al., 2023; Parihar et al., 2022). Клинически ОРИН проявляется азотемией, артериальной гипертензией, протеинурией и тяжелой анемией, что при отсутствии своевременного лечения может быстро прогрессировать в острую почечную недостаточность (Dawson et al., 2010). При микроскопическом исследовании препаратов почки с ОРИН можно наблюдать мезангиолиз, гломерулосклероз, атрофию канальцев и тубулоинтерстициальным фиброзо, что указывает на значительное повреждение сосудистых и паренхиматозных структур почек (Bertoni et al., 2023). При этом в ядрах большинства клеток, особенно клубочков и нефроцитах эпителия канальцев нефронов происходят разрывы ДНК (Cohen et al., 2021; Tampe et al., 2021; Cohen et al., 2021; Zhang et al., 2017; Lenarczyk et al., 2009; Yang et al., 2017; Cohen et al., 2008; Cohen et al., 2002).

Хроническое поражение структур почки, индуцированное ИИ прежде всего сопровождается развитием фиброза различной степени выраженности, так как активируются макрофаги и клетки фибробластического ряда, а также TGF- $\beta$  и интерлейкины (Wang et al., 2021; Klaus et al., 2021; Chung et al., 2018; Webster et al., 2017; Baradaran-Ghahfarokhi, 2012).

Для профилактики обозначенных лучевых изменений структур почки в последнее время важным направлением лучевой терапии и онкологии является применение антиоксидантов и противовоспалительных агентов, которые могут смягчить воспалительный ответ и предотвратить дальнейшее повреждение почек.

Острые и хронические формы радиационно-индуцированной нефропатии требуют глубокого понимания сложных патофизиологических процессов, происходящих на клеточном и молекулярном уровнях. Комплексный подход к терапии, включающий в том числе подбор антиоксидантных препаратов, может значительно улучшить результаты лечения и качество жизни пациентов, подвергшихся радиационному воздействию.

Воспаление, после ИИ является одним из ключевых механизмов повреждения тканей после облучения. Оно обычно связано с немедленным иммунным ответом, в ходе которого активируются провоспалительные цитокины.

Дополнительно происходит опосредованная активация нейтрофилов и макрофагов, мигрирующих к поврежденным участкам, что, в свою очередь, ведет к дальнейшему повреждению тканей и, в тяжелых случаях, хроническому воспалению. Сигнальные молекулы, такие как молекулы адгезии (молекула межклеточной адгезии-1, ICAM-1; васкулярная молекула клеточной адгезии, VCAM) и рецепторные тирозинкиназы, также играют важную роль в развитии воспаления, способствуя адгезии иммунных клеток к эндотелию и проникновению в ткани (Peter, 2015).

Некротические клетки почечных канальцев, подвергшиеся радиационному повреждению, высвобождают молекулярные паттерны, связанные с повреждением, которые инициируют выброс провоспалительных цитокинов и хемокинов клетками, находящимися в тканях, а также привлеченными лейкоцитами (Janko et al., 2012). Например, макрофаги выделяют ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6, что усиливает воспаление и замыкает порочный круг клеточной гибели и воспалительной активности, приводя к постепенному снижению функции почек и началу фиброза (Mulay et al., 2016). Однако последние исследования, проведенные на приматах, показывают, что воспаление не всегда играет доминирующую роль в долгосрочном радиационно-индуцированном повреждении почек. В частности, длительное наблюдение за макаками, подвергшимися фракционному облучению, не выявило значительного увеличения инфильтрации лейкоцитов в почках через 6–8 лет после облучения, что указывает на то, что воспалительная фаза, возможно, завершилась, уступив место фиброзу (van Kleef et al., 2000). Таким образом, острое воспаление может играть более важную роль в ранних стадиях радиационного повреждения, тогда как его значение снижается в более поздние периоды, когда доминируют процессы фиброгенеза.

В некоторых работах показано что, несмотря на отсутствие значительного повышения активности РААС после облучения, ингибирование этой системы может иметь положительный эффект, что может указывать на то, что даже нормальная активность РААС может быть вредной в условиях радиационного воздействия. В частности, снижение оксида азота (NO), антагониста РААС, после

облучения также может способствовать радиационно-индуцированным повреждениям почек, и его балансировка может играть ключевую роль в нейтрализации этих эффектов (Cohen et al., 2010).

Клеточная сенесценция (КС) представляет собой процесс, характеризующийся остановкой клеточного цикла, подавлением апоптотических путей, повышенной метаболической активностью и фенотипом старения, связанным с секрецией (senescence-associated secretory phenotype, SASP). Этот фенотип включает в себя усиленную секрецию ряда провоспалительных и фиброгенных факторов, таких как ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, CTGF (от англ., Connective Tissue Growth Factor, фактор роста соединительной ткани), TGF (от англ., Transforming Growth Factor, трансформирующий фактор роста), VEGF (от англ., Vascular Endothelial Growth Factor, сосудистый эндотелиальный фактор роста), а также фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) (Bernardes de Jesus & Blasco, 2012; Campisi, 2013). КС является частью нормального процесса старения, который характеризуется укорочением теломер (Käsmann et al., 2020; Aratani et al., 2018; Lafargue et al., 2017; McRobb et al., 2017; Schultz-Hector & Balz, 1994).

Было отмечено увеличение секреции ИЛ-6, связанной с SASP, что способствовало воспалительным процессам и фиброзированию почек. Однако секреция других факторов, таких как ФНО- $\alpha$ , ИЛ-8 и VEGF-A, не была значительно увеличена. Эти изменения, включая повреждение клубочков и снижение функции почек, были четко выражены в данной экспериментальной модели, что указывает на важную роль КС в развитии радиационно-индуцированных почечных повреждений (Aratani et al., 2018).

Помимо всего прочего, лучевая травма вызывает васкулярную дисфункцию, нарушая микроциркуляцию и ауторегуляторные функции афферентных артериол почек (Verheij et al., 1994). Эндотелиальная дисфункция, связанная с повреждением эндотелиальных клеток, приводит к их апоптозу и далее некрозу, что, в свою очередь, усугубляет общую ишемию почечной ткани. При этом наблюдается снижение уровня эпоксиэпокситриеновых кислот (ЭКК), производимых СУР-эпоксигеназами в эндотелии, что ухудшает васкулярную дисфункцию, поскольку

эпоксипокситриеновые кислоты обладают защитными свойствами, поддерживая сосудистый тонус и функцию почек. Снижение уровня ЭКК сопровождается усилением проапоптотической активности через путь Fas/FasL, что приводит к увеличению апоптоза почечных клеток и дальнейшему ухудшению функции почек (Liu et al., 2013; Нье Хан et al., 2016).

Фиброз почек представляет собой патологическое образование рубцовой ткани в паренхиме, возникающее как результат неправильного заживления тканей. Этот процесс включает активацию и миграцию миофибробластов, отложение внеклеточного матрикса и ремоделирование почечной ткани. Фиброз является финальной стадией практически всех этиологий хронической болезни почек (ХБП). В условиях острого повреждения тканей механизмы, ведущие к фиброзу, могут способствовать восстановлению, но при хронических состояниях, таких как радиационно-индуцированная нефропатия (РИН), фиброз приводит к утрате функции почек и снижению их работоспособности (Humphreys, 2018; Klaus et al., 2021).

Миофибробласты являются основными клетками, ответственными за синтез внеклеточного матрикса в почках. Среди матриксных белков, участвующих в почечном фиброзе, наиболее распространен коллаген I типа, однако также обнаруживаются коллагены типов II, IV, V и XV. Ключевую роль в стимуляции дифференцировки миофибробластов при почечном фиброзе играет трансформирующий фактор роста бета (TGF- $\beta$ ), который способствует накоплению внеклеточного матрикса и ремоделированию тканей. Другими важными факторами активации миофибробластов и развития фиброза почек являются врожденная и адаптивная иммунные системы, которые усиливают воспалительные процессы и способствуют формированию фиброзных изменений (Genovese et al., 2014; Wick et al., 2013).

Фиброз почек при радиационном воздействии, как правило, является долгосрочным эффектом, проявляющимся через значительное время после облучения. Это подтверждается данными о других формах почечного повреждения, где фиброз развивается постепенно и накапливается в течение

длительного времени. Важно отметить, что блокада ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) с использованием ингибиторов АПФ, а также применение аналогов эпоксиэйкозатриеновых кислот способствуют снижению отложения внеклеточного матрикса и предотвращают развитие фиброза почек в экспериментальных моделях радиационной нефропатии.

Таким образом, радиационно-индуцированный фиброз почек является сложным и многофакторным процессом, включающим в себя каскады биохимических и иммунных реакций, которые приводят к прогрессированию повреждений и ухудшению почечной функции. Оптимизация методов радиотерапии и использование стратегий для предотвращения фиброзирования остаются ключевыми направлениями для улучшения клинических исходов у пациентов, подвергшихся радиационному воздействию.

### **1.5. Стратегии защиты здоровых тканей от радиационного повреждения**

Важным подходом в профилактике и терапии радиационно-индуцированной нефропатии (РИН) является использование антиоксидантов, способных предотвращать или уменьшать радиационные повреждения тканей. В настоящее время ведутся активные исследования различных антиоксидантных соединений и их потенциала в качестве радиопротекторов, которые уменьшают окислительный стресс и защищают клетки от повреждений, вызванных различными типами облучения. Среди наиболее перспективных антиоксидантов рассматриваются N-ацетилцистеин, витамины С и Е, куркумин, эпигаллокатехин галлат, диосмин, кверцетин и различные растительные экстракты, такие как масло черного тмина (*Nigella sativa*) и его активный компонент тимохинон (Aruoma et al., 1989).

*Nigella sativa* и её активный компонент тимохинон продемонстрировали выраженные антиоксидантные, противовоспалительные и антиканцерогенные свойства как в исследованиях *in vitro*, так и *in vivo*. Их антиоксидантные свойства проявляются за счет связывания реактивных форм кислорода (РФК) и азота (РФА), а также снижения окислительного стресса, вызванного ионизирующим излучением

или другими окислительными агентами. Так, эксперименты в этой области показали, что использование масла *Nigella sativa* и тимохинона приводило к уменьшению концентрации липидных гидроперекисей и повышению активности антиоксидантных ферментов, включая параоксоназу и церулоплазмин, что указывает на их потенциальную способность обеспечивать тканеспецифическую радиопротекцию почек (Hannan et al., 2021).

Кверцетин, флавоноид, широко распространенный в растительном мире, также проявляет антиоксидантные свойства и способен защищать клетки от окислительного стресса, вызванного радиацией. Он действует путем снижения уровня РФК, ингибирования воспалительных процессов и активации путей апоптоза. В исследованиях показано, что кверцетин способен снижать радиационно-индуцированные повреждения тканей посредством инактивации РФК (Deerika & Maurya, 2022).

N-ацетилцистеин (N-АЦ) также показал свою эффективность в снижении окислительного стресса и повреждений почек, вызванных радиацией. В исследованиях на животных было установлено, что введение N-АЦ значительно уменьшает уровень малонового диальдегида и экспрессию каспазы-3, одновременно увеличивая уровень глутатиона в тканях почек. Это подчеркивает его потенциал как антиоксиданта, который может применяться для предотвращения радиационно-индуцированной нефропатии (Zhitkovich, 2019).

Среди всех упомянутых антиоксидантов, аскорбиновая кислота (витамин С) выделяется как один из наиболее перспективных радиопротекторов благодаря своей уникальной химической структуре и способности активно участвовать в окислительно-восстановительных реакциях. Результаты ряда исследований продемонстрировали, что аскорбиновая кислота эффективно ингибирует биомаркеры окислительного стресса, модулируя экспрессию сигнальных каскадов клеточного ответа, регулируя процессы апоптоза и способствуя репарации повреждений ДНК, тем самым снижая степень выраженности радиационно-индуцированной травмы.

Аскорбиновая кислота способна демонстрировать свои протекторные свойства, защищая клеточные структуры почек от повреждений, вызванных окислением липидов, белков и ДНК, и снижает накопление железа в почечных тканях, что, в свою очередь, уменьшает липидную перекисидацию и уровень некроза канальцев. Она также поддерживает уровень глутатиона, что способствует снижению воспаления и улучшению функции почек. Это делает аскорбиновую кислоту особенно перспективной для использования в комплексной терапии радиационно-индуцированных повреждений.

### **1.6. Заключение по обзору литературы**

Почки являются одним из наиболее часто повреждаемым органом после влияния лучевой терапии. В отечественной и зарубежной литературе практически отсутствуют комплексные данные о гистологических и молекулярно-биологических особенностях (оценка пролиферации, апоптоза – как ключевых слагаемых гистогенеза, коллагенообразования) структур почки после воздействия электронами, что подчёркивает научную новизну и теоретическую значимость диссертационной работы. Это необходимо для выбора оптимальных доз облучения, прогнозирования развития радиационно-индуцированного фиброза, а также разработки эффективных методов его профилактики и терапии. Перечисленные вопросы остаются актуальными и малоизученными, а механизмы развития и специфические (таргетные) меры профилактики и лечения постлучевых осложнений изучены недостаточно. Выбранные дозы укладываются в стандартный диапазон и являются оптимальными для проведения эксперимента в рамках доклинического исследования.

В связи с этим актуальной задачей современной клеточной биологии, радиобиологии и молекулярной фармакологии является создание экспериментальных моделей для изучения морфологических изменений в эндотелии сосудистых клубочков, эпителии проксимальных и дистальных отделов канальцев нефрона после облучения электронами, включая сопутствующие

нарушения пролиферативно-апоптотического баланса и степени воспалительной реакции.

Помимо этого, не менее актуальной является разработка и апробация методов радиопротекции в различных органных моделях радиационного повреждения. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты в качестве защитного субстрата может быть предложено для внедрения в клиническую практику при проведении лучевой терапии онкологическим пациентам, однако раскрытие точных механизмов ее протекции и индукции репарации после воздействия электронов в поврежденных тканях остается малоизученным, что требует проведения комплексных молекулярно-биологических исследований.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Диссертационная работа выполнялась на базе Института трансляционной медицины и биотехнологии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет) и экспериментального радиологического сектора Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

### 2.1. Дизайн исследования

В экспериментальном исследовании использовали животных – самцов крыс породы Вистар (*Rattus Wistar*; вес  $220 \pm 20$  грамм; возраст 9–10 недель;  $n=90$ ), которые были поделены на группы:

I – контрольная ( $n=15$ ), введение физиологического раствора (0.9% NaCl, интраперитонеально);

II ( $n=15$ ), локальное облучению электронами в разовой очаговой дозе 2 Гр;

III ( $n=15$ ), локальное облучению электронами в разовой очаговой дозе 8 Гр;

IV ( $n=15$ ), введение аскорбиновой кислоты (50 мг/кг, интраперитонеально) за 60 минут до облучению электронами в разовой очаговой дозе 2 Гр;

V ( $n=15$ ), введение аскорбиновой кислоты (50 мг/кг, интраперитонеально) за 60 минут до облучению электронами в разовой очаговой дозе 8 Гр;

VI ( $n=15$ ), введение аскорбиновой кислоты (50 мг/кг, интраперитонеально).

Животные содержались в виварии с контролируемыми условиями среды, включая постоянную температуру  $22^{\circ}\text{C}$ , влажность 40 – 60%, а также стандартный световой цикл (12L:12D). Животные имели свободный доступ к воде и корму *ad*

*libitum*. Крыс содержали в полимерных боксах с 5 мм слоем подстила, который выполнял абсорбционную, терморегуляционную, и гигиеническую функции.

Объектом исследования являлись почки, которые первоначально подвергались макроскопической оценке с целью выявления признаков повреждений, гипоксических изменений, а также воспалительных или неопластических процессов.

Топография облучения обусловлена теоретическими материалами из специализированной литературе по теме исследования, собственным опытом, протоколами и руководствами по работе с лабораторными животными и проведению доклинических исследований.

## **2.2. Модель облучения электронами и введение аскорбиновой кислоты**

Выбор режима облучения и экспериментальных доз был проведен на основании литературных данных и отечественных рекомендаций по использованию лучевой терапии при лечении злокачественных новообразований почек.

В онкологических и профильных ЛПУ радиотерапию ЗНО почек проводят, согласно Клиническим рекомендациям «Рак почки» под ред. акад. РАН, проф. А.Д. Каприна, разработанным большим коллективом специалистов онкологов, радиобиологов, морфологов ведущих профильных онкологических центров и НИИ. Они согласуются с международными протоколами National Comprehensive Cancer Network по лучевой терапии при лечении рака почки (NCCN Guidelines Insights: Kidney Cancer, Version 2.2024, 2024 г., NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2016 г.).

Подход к выбору метода лечения пациентов со злокачественными новообразованиями почек должен быть персонализированным, учитывающим широкий спектр факторов. Необходимо принимать во внимание степень распространенности опухоли, ее расположение, прогнозируемые исходы (включая данные лабораторных исследований), общее состояние здоровья пациента (с

учетом степени тяжести сопутствующих заболеваний, пола пациента, возрастной группы) и предполагаемую продолжительность жизни.

Согласно установленным стандартам, дозировка и схема лучевой терапии определяются различными аспектами: цели облучения (терапевтическое, профилактическое, интраоперационное вмешательство, адъювантная терапия в сочетании с цитотоксическими, цитостатическими или моноклональными препаратами), продолжительность курса, место воздействия и другие факторы.

В настоящей работе были выбраны дозы облучения, которые наиболее распространены в доклинических исследованиях, аналогичные тем, что используются в клинической практике при лечении ЗНО почек. В частности, дозы 2 Гр и 8 Гр были выбраны для одиночного локального облучения, чтобы оценить их влияние на радиационно-индуцированные повреждения почки. Такой подход учитывает не только использование высоких доз для интенсивного лечения ЗНО почки (например, почечно-клеточный рак), но и другие формы облучения, которые применяются для радиотерапии ЗНО брюшной полости, забрюшинного пространства и малого таза.

Доза 2 Грей (однократно) – установлена опытным путем в пилотном исследовании как минимальная доза, способная вызывать обратимые радиационно-индуцированные повреждения почки. При использовании этой дозы регенерация почек возможна в полном объеме при использовании вспомогательной лекарственной терапии.

Доза 8 Грей (однократно) была использована как наиболее используемая в доклинических исследованиях на лабораторных животных и применяемая для первичного подтверждения воздействия ионизирующего излучения любого вида.

Дополнительно, следует учитывать, что ускоритель электронов «NOVAC-11», использованный в нашем исследовании, имеет дельту погрешности в размере до 10% от необходимой дозы.

Место облучения электронами – отдел радиационной биофизики МРНЦ А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (г. Обнинск, Россия). Ускоритель электронов – «NOVAC-11» (S.I.T. Sordina IORT Technologies

S.P.A., Италия) с параметрами: 10 МэВ, а диаметр коллимированного поля – 40 мм, частота импульса – 9 Гц. Животных подвергались седации перед облучением путем однократного введения кетамина (50 мг / кг, внутримышечно) и ксилазина (5 мг / кг, внутривенно). После проведения процедуры седации, каждое животное фиксировали в положении лежа на животе с разведенными конечностями на исследовательском столике, что обеспечивало наилучший доступ к целевой области почек. Для фиксации и предотвращения движений во время процедуры применялись специальные удерживающие устройства (запатентованные салазки). Остальные части тела, такие как сердце и легкие, которые не должны были подвергаться облучению, были экранированы для создания радиационной тени. Для достижения высокой точности облучения тубус аппарата размещали на расстоянии менее двух миллиметров от поверхности кожи, направляя его строго перпендикулярно к целевой зоне.

#### *Аскорбиновая кислота*

В качестве теоретического радиопротективного препарата после комплексного анализа литературных данных была выбрана аскорбиновая кислота – в (профилактической) дозе 50 мг/кг; форма введения – интраперитонеальная инъекция за 60 минут до облучения электронами (среднее время, необходимое для всасывания и наступления радиопротективного эффекта).

Доза аскорбиновой кислоты была установлена экспериментально, основываясь на предварительных испытаниях подбора доз, в рамках которых проводилось апробирование различных доз – 30 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг. В основу расчета была положена средняя терапевтическая доза для человека ( $D_{ср}$ ), которая затем пересчитывалась с учетом массы тела. Полученные значения трансформировались в эквивалентные дозировки для лабораторных крыс с использованием корректирующих коэффициентов в соответствии с рекомендациями по доклиническим исследованиям лекарственных препаратов. В ходе пилотного исследования установлено, что наибольшую эффективность

аскорбиновая кислота демонстрировала в дозе 50 мг/кг. Животные группы, получавших препарат в этой дозировке, демонстрировали минимальные побочные эффекты препарата и наилучшие показатели репарации почечной ткани (при нормальных почечных, и других физиологических и функциональных показателях жизнедеятельности животных).

#### *Выведение животных из эксперимента*

Животные всех групп подвергались гуманной эвтаназии на 7-е сутки путем введения высоких доз анестетиков: кетамина (50 мг/кг, внутримышечно) и ксилазина (5 мг/кг, интраперитонеально). Эта процедура была тщательно спланирована для обеспечения быстрого и безболезненного прекращения жизнедеятельности, минимизируя стресс и дискомфорт у подопытных животных.

#### *Соответствие этическим правилам и нормам*

Все манипуляции осуществлялись в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (ЕЭС, Страсбург, 1985 г.), Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ЕЭС, Страсбург, 1986 г.; ETS №123), Правилами лабораторной практики и приказом Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», Приказом №755 от 12.08.1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных», Приказом №742 от 13.11.1984 г. «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и Хельсинской декларацией (1964).

Комиссия по биоэтическому контролю за содержанием и использованием лабораторных животных в научных целях федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр

радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации одобрила проведение научного исследования на тему «Морфофункциональные особенности сосудистых клубочков почки после локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты». Выписка из протокола №6 от 27.04.2023 г.

### **2.3. Методы исследования**

Использован следующий комплекс методов: иммуноферментный, биохимический, гистологический, морфометрический, иммуногистохимический, статистический.

Наблюдение за животными проводилось дважды в день (утром и вечером), с обязательным мониторингом их поведенческих реакций, состояния слизистых оболочек и кожных покровов. Оценка массы тела осуществлялась ежедневно. Температура тела измерялась ректально с использованием цифрового термометра (Braun, Kronberg, Германия) для точного контроля физиологических параметров после воздействия облучения. По окончании эксперимента, после изъятия почки, проводилась макроскопическая оценка морфологического состояния органа.

Для оценки ранних и отсроченных побочных эффектов радиотерапии использовали шкалы RTOG (от англ., Acute Radiation Morbidity Scoring Criteria) и RTOG/EORTC (от англ., Late Radiation Morbidity Scoring Scheme) (Cox et al., 1995).

#### **2.3.1. Иммуноферментный анализ**

Оценку оксидативного стресса, активности антиоксидантной системы, а также апоптотических процессов и клеточного стресса в почечной ткани использовался метод ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Фрагменты почечной ткани были гомогенизированы и затем центрифугированы при 13,000 об/мин в течение 10 минут при температуре 4 °С. Полученный супернатант сохраняли при –80 °С для дальнейшего анализа. Уровни малонового диальдегида (MDA), супероксиддисмутазы (SOD), глутатиона (GSH), каспазы-3 и p53

измерялись с использованием коммерческих наборов ELISA (Lifespan Biosciences, США). Анализы проводились согласно протоколам производителей, а результаты считывались при длине волны 450 нм с использованием микропланшетного ридера ELISA (Lifespan Biosciences, США).

Выбранные биомаркеры позволяют оценить различные аспекты клеточного ответа на радиационное повреждение. Уровень MDA используется для оценки степени оксидативного стресса, так как он является продуктом перекисного окисления липидов и деградации полиненасыщенных жирных кислот под воздействием активных форм кислорода. Супероксиддисмутаза (SOD) и глутатион (GSH) отражают активность эндогенной антиоксидантной системы: SOD катализирует дисмутацию супероксидных радикалов в кислород и перекись водорода, а GSH играет ключевую роль в защите клеток от окислительного повреждения путем нейтрализации свободных радикалов и восстановления других антиоксидантов.

Уровень каспазы-3 служит маркером апоптоза, так как этот фермент участвует в каскаде процессов, ведущих к программируемой клеточной гибели. Изменение уровня p53 указывает на активацию сигнальных путей, связанных с клеточным стрессом, репарацией ДНК и апоптозом.

### **2.3.2. Биохимическое исследование**

Для комплексной оценки функционального состояния почек, уровня воспаления и повреждения тканей в условиях радиационного воздействия электронами использовались биохимические методы анализа сыворотки крови. Уровни креатинина, азота мочевины, и С-реактивного белка (СРБ) в крови измерялись с использованием коммерческих наборов (Pars Azemoon, Иран), а концентрация цистатина С определялась количественным методом иммуноферментного анализа (ELISA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay) с использованием набора для крыс (Cusabio, Китай). Также в сыворотке крови определялись уровни ключевых провоспалительных цитокинов – ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6

(Bender MedSystems, Австрия) и ФНО- $\alpha$  (Assaypro, США), используя коммерческие ELISA-наборы согласно инструкциям производителей.

Измерение уровней креатинина и азота мочевины позволяет оценить степень повреждения почек, поскольку эти маркеры являются основными показателями функции почек. Определение соотношения цистатина С к креатинину предоставляет более точную информацию о функциональном состоянии почек и помогает выявить ранние признаки почечной недостаточности. В то же время, измерение уровней цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  дает возможность оценить степень воспалительного ответа, индуцированного радиационным воздействием, что является важным фактором в развитии радиационно-индуцированной нефропатии.

### **2.3.3. Гистологическое исследование**

Для гистологического исследования почки фиксировали в 10% забуференном формалине, проводили в аппарате гистологической проводки тканей («Leica Biosystems», Германия): в кассетах обезвоживали в растворах спиртов восходящей концентрации (50%, 60%, 70%, 80%, 96% и абсолютный), просветляли в ксилоле, выдерживали при +37 °С в насыщенном растворе парафина в ксилоле, помещали в парафин при +56 °С. В последующем материал заливали в смесь парафин-воск с образованием парафиновых блоков, из которых на автоматическом ротационном микротоме (Leica RM 2255, Германия) готовили серийные срезы толщиной около 2 – 3 мкм, которые окрашивали гематоксилином Майера и эозином или подготавливали для гистохимического и иммуногистохимического исследований на специальных адгезивных предметных стеклах.

Учитывая, что радиационная нефропатия проявляется поражениями сосудистых клубочков, такими как тромботическая микроангиопатия и коллапс, а также повреждениями канальцев нефрона и интерстициального компонента, приводящими к гломерулосклерозу и тубулоинтерстициальному фиброзу, для оценки степени патологических изменений применяли метод световой

микроскопии. В 10-ти случайных полях зрения при увеличении  $\times 400$  изучали вакуолизацию, дистрофию, атрофию клубочков и канальцев нефрона, а также наличие воспаления и некроза. Полученные гистологические микропрепараты анализировали в указанных полях зрения светового микроскопа.

#### **2.3.4. Морфометрическое исследование**

Морфометрический анализ микропрепаратов почки, окрашенных гематоксилином и эозином, проводили в 10-ти случайно выбранных полях зрения светового микроскопа при увеличении  $\times 400$  с использованием программного обеспечения Leica Application Suite, Version 4.9.0. Компьютерную морфометрию осуществляли при помощи компьютерной системы анализа изображений ImageJ.

Количество поврежденных клубочков и почечных канальцев корковых нефронов с признаками вакуолизации, дистрофии и атрофии оценивали по модифицированной системе классификации Banff (Banff 2019) с использованием компьютерной программы анализа изображений Software DP-SOFT (LAP GmbH, Германия). Исследовали 40 случайно выбранных сосудистых клубочков в поле зрения при увеличении  $\times 200$ , и выражали их в процентах площади поражения: 0 – отсутствуют; 1 – слабые ( $<25\%$ ); 2 – умеренные ( $25-50\%$ ); 3 – тяжелые ( $>50\%$ ).

Для проведения морфометрического анализа распределения волокнистого компонента (фиброза интерстициальной ткани почки) использовали методику окрашивания трихромом по Массону. Оценку проводили с помощью компьютерной морфометрии, согласно адаптированной методике для морфометрического анализа (Choi SE, 2023), анализируя площадь и оптическую плотность окрашивания коллагеновых волокон. Выраженность фиброза оценивалась в баллах: 0 – отсутствие фиброза; 1 – слабая степень ( $0 - 0,3$ ;  $<25\%$  площади поражения); 2 – умеренная степень ( $0,3 - 0,6$ ;  $25 - 50\%$  площади поражения); 3 – сильная степень ( $0,6 - 0,9$ ;  $50 - 75\%$  площади поражения); 4 – выраженная степень ( $>0,9$ ;  $>75\%$  площади поражения).

Оценку очагового некроза клубочка и некробиотических изменений (некроза) эпителия проксимальных и дистальных канальцев нефрона проводили в баллах по следующим критериям: 0 – изменения отсутствуют; 1 – 1/3 площади поражения; 2 – 2/3 площади поражения; 3 – более 2/3 площади поражения.

### 2.3.5. TUNEL исследование

Для оценки фрагментации ДНК в клетках клубочков и нефроцитах был использован TUNEL метод (маркировка терминальной трансферазы; dUTP Nick End Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) на парафиновых срезах почки толщиной 3 мкм. Антигенная демаскировка осуществлялась кипячением срезов в 10 мМ цитратном буфере (рН 6,0) в течение 12 минут для раскрытия эпитопов. После демаскировки антигена срезы фиксировались в 4% параформальдегиде (рН 7,4) при температуре -20°C в течение 3 минут для обеспечения сохранности ткани. Затем срезы четыре раза промывались фосфатно-солевым буфером (PBS) для удаления остатков фиксатора. Для обеспечения оптимальной проницаемости реагентов ткани подвергались обработке 0,1% раствором Triton X-100.

TUNEL анализ проводили инкубированием подготовленных срезов с реактивом, содержащим терминальную дезоксирибонуклеотидилтрансферазу (TdT) и меченый флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) dUTP, что позволяет маркировать фрагментированную ДНК, свидетельствующую об апоптозе. После завершения TUNEL анализа, для выявления ядер клеток выполняли окрашивание 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI), инкубируя срезы в растворе DAPI и промывая в PBS. Окрашенные срезы почки монтировались в PBS и анализировались под флуоресцентным микроскопом, оснащенный УФ-светом, для визуализации FITC-меченых фрагментов ДНК, свидетельствующих об апоптозе, и DAPI-меченых ядер. Все морфометрические оценки выполнялись в слепом режиме не менее чем пятью независимыми исследователями для обеспечения объективности оценки. TUNEL-позитивные клетки подсчитывали в процентах

### 2.3.6. Иммуногистохимическое исследование

Фрагменты почек исследовали иммуногистохимическим методом. Для этого использовали парафиновые срезы толщиной 2 – 3 мкм, которые сначала подвергали депарафинизации, а затем обрабатывали 0,3% раствором перекиси водорода в метаноле в течение 30 минут. После этого срезы подвергались термической обработке в автоклаве в цитратном буфере при pH 6,0 в течение 20 минут. Инкубация с первичными антителами проводилась в течение 12 часов. Первичные антитела к Ki-67 (Ki-67; Thermo Fisher Scientific Inc., США; клон – MM1, разведение – 1:100), каспазе-3 (Cas-3; Thermo Fisher Scientific Inc., США; клон – 74T2, разведение – 1:100), интерлейкину-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ; Thermo Fisher Scientific Inc., США; клон – P420B, разведение – 1:100), интерлейкину-6 (IL-6; Thermo Fisher Scientific Inc., США; клон – MP5-20F3, разведение – 1:100), цитокину ФНО- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; Thermo Fisher Scientific Inc., США; клон – PA1-40281, разведение – 1:100) интерлейкину-10 (IL-10; Thermo Fisher Scientific Inc., США; клон – JES3-9D7, разведение – 1:100), интерлейкину-4 (IL-4; Thermo Fisher Scientific Inc., США; клон – 11B11, разведение – 1:100). Вторичные антитела – универсальная двухкомпонентная система HiDef Detection™ HRP Polymer («Cell Marque», США), включающая анти-IGG мыши/кролика, пероксидазу хрена (HRP) и DAB-субстрат. Ядра клеток дополнительно окрашивали гематоксилином Майера.

Подсчет количества иммунопозитивных клеток проводили в 10 случайно выбранных полях зрения при увеличении  $\times 400$  (в %). Количество воспалительных клеток после ИГХ-реакции с антителами к провоспалительным и противовоспалительным цитокинам определяли на 1 мм<sup>2</sup> методом, аналогичным морфометрической оценке количества других клеток. Дополнительно, для подтверждения полученных результатов плотность воспалительных клеток рассчитывали по формуле [7] с общей площадью 1,6 мм<sup>2</sup>.

Микроскопический анализ выполнялся с использованием системы видеомикроскопии (микроскоп Leica DM2000, Германия; камера Leica ICC50 HD; компьютер Platrun LG).

### 2.3.7. Статистические методы

В работе использованы методы оценки достоверности различий, зарекомендовавшие себя как наиболее эффективные статистические модели, чаще всего используемые в медицине. Все количественные данные были формализованы и внесены в электронные таблицы Microsoft Excel (версия 14.0.4760.1000, 32-разрядная) для последующего анализа.

Первоначально для всех количественных переменных проводилась проверка на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. В случаях, когда данные соответствовали нормальному распределению, результаты представлялись как среднее арифметическое ( $M$ )  $\pm$  стандартное отклонение ( $SD$ ) или стандартная ошибка среднего ( $SE$ ). Для сравнения групп с нормально распределенными данными применялся дисперсионный анализ ( $ANOVA$ ) с последующими апостериорными тестами.

Для данных, распределение которых отличалось от нормального (в частности, для балльных оценок морфологических изменений), результаты представлялись в виде медианы ( $Me$ ) и интерквартильного диапазона ( $IQR$ ), обозначающего 25-й и 75-й перцентили ( $Q1 - Q3$ ). Сравнение трех и более независимых групп с ненормальным распределением осуществлялось с помощью  $H$ -критерия Краскела-Уоллиса с последующим апостериорным критерием Данна. Парные сравнения проводились при помощи  $U$ -критерия Манна-Уитни.

Статистическая обработка данных иммуногистохимического и морфометрического исследований выполнялась с использованием программного пакета SPSS версии 12.0 для Windows (IBM Analytics, США) и Microsoft Excel (версия 14.0.4760.1000, 32-разрядная).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Макроскопическое исследование

При оценке массы тела крыс во всех группах исследования было отмечено снижение массы тела по сравнению с контрольной группой. К 7 суткам эксперимента масса тела животных во II и III группах (однократное облучение электронами в РОД 2 Гр и РОД 8 Гр) снизилась на 15,3 % и 17,8 % по сравнению с контрольной группой. У животных в IV и V группах масса тела была выше на 9,8 % и 7,6 % соответственно, относительно значений, зарегистрированных во II и III группах (Таблица 3.1).

Анализ массы почки крыс показал снижение массы органа после воздействия электронами по сравнению с контрольной группой. На 7 сутки масса органа у животных во II группе снизилась на 7,1% по сравнению с контрольной группой, в то время как в III группе снижение массы почки составило 15,4%. Введение аскорбиновой кислоты животным в IV и V группах позволило уменьшить степень выраженности снижения массы почки. У животных IV группы масса почки увеличилась на 4% по сравнению с таковыми значениями во II группе, а в V группе увеличение массы почки составило 5,6% относительно значений, зарегистрированных в III группе. В VI группе масса почки животных была на 1,6% выше, чем в контрольной группе (Таблица 3.1).

#### 3.1.1. Визуальная оценка ранних (острых) эффектов электронотерапии

При макроскопическом исследовании почек крыс контрольной группы (интактные животные) они имели нормальную структуру, однородную окраску и размеры, соответствующие анатомическим и физиологическим нормам, без признаков отека, воспаления или некроза. Аналогичную картину наблюдали у животных VI группы.

На 7-е сутки во II группе у 70,2% животных показали незначительное изменение окраски (добавление сероватого оттенка), что указывало на начальные признаки отека и гипоксии ткани почки (1 балла по шкале RTOG; Таблица 3.2). В III группе у 88,1% животных было отмечено умеренное увеличение объема почек с признаками точечных кровоизлияний на поверхности и признаками отека, что соответствовало умеренным изменениям ткани почки (2 балла по шкале RTOG; Таблица 3.2).

Введение аскорбиновой кислоты в IV и V группах снизило выраженность изменений. Так, в IV группе у 84,8% животных макроскопическая анатомо-физиологическая структура почек оставалась близкой к норме, с минимальными изменениями (0 – 1 балл по шкале RTOG). В V группе у 66,9% животных наблюдали легкую степень отека и гиперемии почки (1 балл по шкале RTOG, Таблица 3.2).

Таблица 3.1 – Вес тела животных и масса почки и возраст крыс на 7 сутки в контрольной группе, после облучения электронами в РОД 2 Гр, 8 Гр, а также введения аскорбиновой кислоты

Группа	n	Возраст, нед.	Вес животного через 7 сут, М±m	Масса почки через 7 сут, М±m
Контроль	15	9–10	220,3±10,6	2,16±0,03
Облучение (РОД) 2 Гр	15	9–10	196,4±4,7 <sup>a</sup>	1,76±0,01 <sup>a</sup>
Облучение (РОД) 8 Гр	15	9–10	181,2±6,1 <sup>б</sup>	1,62±0,02 <sup>б</sup>
Облучение (РОД) 2 Гр + АК	15	9–10	206,4±2,1 <sup>B</sup>	1,83±0,02 <sup>B</sup>
Облучение (РОД) 8 Гр + АК	15	9–10	193,4±3,4 <sup>Г</sup>	1,71±0,03 <sup>Г</sup>
Аскорбиновая кислота	15	9–10	226,1±5,7	2,26±0,02

Статистически значимые различия между группами ( $p < 0,05$ ): <sup>a</sup> контроль и РОД 2 Гр (однократно); <sup>б</sup> контроль и РОД 8 Гр (однократно); <sup>B</sup> РОД 2 Гр + аскорбиновая кислота и РОД 2 Гр (однократно); <sup>Г</sup> РОД 8 Гр + аскорбиновая кислота и РОД 8 Гр (однократно).

Таблица 3.2 – Оценка изменений в почке в соответствии с балльной шкалой RTOG acute radiation morbidity scoring criteria

Группа	n	Балл по шкале RTOG	Процентное соотношение (%)
Контроль	15	0	100 %
Облучение (РОД) 2 Гр	15	0–1	0 баллов – 30 %
			1 балл – 70 %
Облучение (РОД) 8 Гр	15	0–2	0 баллов – 3 %
			1 балл – 9 %
			2 балла – 88 %
Облучение (РОД) 2 Гр + АК	15	0–1	0 баллов – 15 %
			1 балл – 85 %
Облучение (РОД) 8 Гр + АК	15	0–1	0 баллов – 33 %
			1 балл – 67 %
Аскорбиновая кислота	15	0	100 %

### 3.2. Иммуноферментный анализ

Оценка уровня оксидативного стресса (малоновый диальдегид, MDA) и активности антиоксидантной системы (супероксиддисмутаза, SOD; глутатион, GSH) в тканевом гомогенате почек проводилась методом иммуноферментного анализа после однократного электронного облучения в режимах РОД 2 Гр и РОД 8 Гр.

При этом было выявлено значительное увеличение уровня MDA в 3,1 раза и 7,3 раза соответственно по сравнению с контрольной группой. Одновременно с этим в группе III наблюдалось снижение концентрации SOD на 31,4 % и GSH на 28,2 %, что свидетельствует об истощении антиоксидантной защиты и высокой степени оксидативного стресса в почечной ткани (Таблица 3.3). Введение аскорбиновой кислоты перед облучением в IV и V группах привело к частичному снижению уровня MDA и стабилизации показателей SOD и GSH. В этих группах наблюдались незначительные изменения показателей MDA, SOD и GSH по сравнению с контрольными значениями. В VI группе уровень MDA был незначительно ниже (на 7,1 %) по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ), тогда как уровни SOD и GSH оставались на уровне контрольных значений (Таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Оценка концентраций малонового диальдегида (MDA), супероксиддисмутазы (SOD) и глутатиона (GSH) в гомогената почечной ткани на 7-е сутки после облучения электронами в разных дозах и введения аскорбиновой кислоты

Группа	MDA, нМоль/мг белка	SOD, Ед/мг белка	GSH, мкМоль/мг белки
Контроль	11,2±0,3	63,9±4,6	11,2±0,6
Облучение (РОД) 2 Гр	34,6±2,7 <sup>а</sup>	53,4±3,1 <sup>а</sup>	9,4±0,5 <sup>а</sup>
Облучение (РОД) 8 Гр	79,5±4,2 <sup>б</sup>	42,1±2,2 <sup>б</sup>	8,1±0,3 <sup>б</sup>
Облучение (РОД) 2 Гр + АК	26,8±3,1 <sup>В</sup>	57,5±1,7 <sup>В</sup>	10,4±0,7 <sup>В</sup>
Облучение (РОД) 8 Гр + АК	38,8±2,1 <sup>Г</sup>	48,8±3,6 <sup>Г</sup>	9,1±0,3 <sup>Г</sup>
Аскорбиновая кислота	10,4±0,4	59,8±2,8	12,8±0,8

Статистически значимые различия между группами ( $p < 0,05$ ): <sup>а</sup> контроль и РОД 2 Гр (однократно); <sup>б</sup> контроль и РОД 8 Гр (однократно); <sup>В</sup> РОД 2 Гр + аскорбиновая кислота и РОД 2 Гр (однократно); <sup>Г</sup> РОД 8 Гр + аскорбиновая кислота и РОД 8 Гр (однократно).

При оценке апоптотической активности в гомогенате почечной ткани у животных II и III группы наблюдалось существенное повышение концентрации апоптотических маркеров: каспазы-3 (в 3,3 и 5,1 раза) и p-53 (в 1,4 и 1,9 раза) относительно контрольных значений (Таблица 3.4). Введение аскорбиновой кислоты в IV и V группах способствовало снижению уровней каспазы-3 и p-53 по сравнению с группами моно-облучения. В VI группе изменения уровней каспазы-3 и p-53 по сравнению с контрольной группой не были статистически значимыми (Таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Оценка уровней каспазы-3 и p-53 в гомогенате почечной ткани на 7-е сутки после облучения электронами в разных дозах и введения аскорбиновой кислоты

Группа	Каспаза-3, нг/мг	P53, нг/г
Контроль	1,8±0,3	19,1±1,2
Облучение (РОД) 2 Гр	6,2±0,6 <sup>a</sup>	28,5±0,7 <sup>a</sup>
Облучение (РОД) 8 Гр	9,3±0,9 <sup>б</sup>	37,6±2,2 <sup>б</sup>
Облучение (РОД) 2 Гр + АК	4,4±0,7 <sup>B</sup>	23,0±1,3 <sup>B</sup>
Облучение (РОД) 8 Гр + АК	6,8±0,8 <sup>Г</sup>	32,4±1,9 <sup>Г</sup>
Аскорбиновая кислота	1,5±0,2	18,6±0,9

Статистически значимые различия между группами: <sup>a</sup> контроль и РОД 2 Гр (однократно),  $p < 0,05$ ; <sup>б</sup> контроль и РОД 8 Гр (однократно) при  $p < 0,05$ ; <sup>B</sup> РОД 2 Гр + аскорбиновая кислота и РОД 2 Гр (однократно) при  $p < 0,01$ ; <sup>Г</sup> РОД 8 Гр + аскорбиновая кислота и РОД 8 Гр (однократно) при  $p < 0,01$ .

### 3.3. Биохимическое исследование

При исследовании биохимических показателей крови в экспериментальных группах регистрировали изменения по сравнению с группой контроля. В частности, уровни креатинина в сыворотке крови II и III групп значительно увеличились по сравнению с контрольными значениями ( $p < 0,05$ ). В то же время, в IV и V группах при сравнении с контрольными показателями изменения были менее выраженными ( $p < 0,05$ ). В VI группе не было отмечено статистически достоверных изменений по сравнению с контрольной группой (Таблица 3.5).

Уровень азота мочевины в сыворотке крови был также выше во всех группах, подвергшихся облучению, по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ). Биохимические показатели уровня азота мочевины IV и V групп были ниже по сравнению со II и III группами. В VI группе не было отмечено изменений измеряемых показателей по сравнению с контрольной группой (Таблица 3.5).

В ходе исследования также выявлено значительное увеличение уровня С-реактивного белка (СРБ) в крови у животных II и III групп по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). При предлучевом введении аскорбиновой кислоты увеличение уровня СРБ было незначительным в IV и V группах. В VI группе не было выявлено статистически значимых изменений уровня СРБ по сравнению с контрольной группой (Таблица 3.5).

Отношение цистатина С к креатинину в сыворотке крови было выше во II и III группах по сравнению с контрольными значениями. В то же время в IV и V группах значение данного биохимического параметра было ниже относительно II и III групп. В VI группе не было выявлено статистически значимых изменений отношения цистатина С к креатинину по сравнению с контрольной группой (Таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Оценка уровней креатинина, С-реактивного белка, азота мочевины и соотношения цистатина С к креатинину в сыворотке крови на 7-е сутки после облучения электронами в разных дозах и введения аскорбиновой кислоты

Группа	Креатинин, мг / дл	С-реак. белок, мг / л	Уровень азота мочевины, мг / дл	Цист. С / креатинин, нг / мл / мг / дл
Контроль	0,516±0,005	2,11±0,031	16,24±0,27	6,0±0,14
Облучение (РОД) 2 Гр	0,563±0,015 <sup>а</sup>	2,81±0,029 <sup>а</sup>	18,56±0,38 <sup>а</sup>	6,15±0,07 <sup>а</sup>
Облучение (РОД) 8 Гр	0,641±0,024 <sup>б</sup>	3,54±0,21 <sup>б</sup>	22,1±0,13 <sup>б</sup>	7,18±0,1 <sup>б</sup>
Облучение (РОД) 2 Гр + АК	0,524±0,002 <sup>В</sup>	2,63±0,12 <sup>В</sup>	17,18±0,31 <sup>В</sup>	6,20±0,05 <sup>В</sup>
Облучение (РОД) 8 Гр + АК	0,537±0,003 <sup>Г</sup>	3,17±0,095 <sup>Г</sup>	19,75±0,12 <sup>Г</sup>	6,74±0,18 <sup>Г</sup>
Аскорбиновая кислота	0,519±0,001	2,22±0,134	15,88±0,26	6,03±0,12

Статистически значимые различия между группами ( $p < 0,05$ ): <sup>а</sup> контроль и РОД 2 Гр (однократно); <sup>б</sup> контроль и РОД 8 Гр (однократно); <sup>В</sup> РОД 2 Гр + аскорбиновая кислота и РОД 2 Гр (однократно); <sup>Г</sup> РОД 8 Гр + аскорбиновая кислота и РОД 8 Гр (однократно).

Уровни провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО- $\alpha$  и ИЛ-10 в крови животных изменялись в зависимости от дозы облучения и предлучевого введения аскорбиновой кислоты (Рисунок 3.2 – 3.4).

В II и III группах было зафиксировано значительное увеличение уровня ИЛ-1 $\beta$  по сравнению с контрольными значениями, при этом особенно выраженное увеличение было зафиксировано в III группе (в 3,2 раза). Введение аскорбиновой кислоты перед облучением в IV и V группах статистически значимо снижало уровень ИЛ-1 $\beta$  по сравнению с группами, получившими только облучение ( $p < 0,01$ ). В VI группе не было обнаружено статистически значимых различий относительно контрольной группы.

Аналогичная картина наблюдалась и для уровня ИЛ-6. В II и III группах уровень ИЛ-6 в крови был значительно выше по сравнению с контролем – в 2,6 раза и 2,9 раза соответственно ( $p < 0,05$ ). Введение аскорбиновой кислоты в IV и V группах способствовало снижению концентрации ИЛ-6 по сравнению с группами, получившими только облучение ( $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ ). В VI группе не было выявлено достоверных различий относительно контроля.

При определении концентрации ФНО- $\alpha$  в крови также было обнаружено увеличение его уровня в группах моно-облучения по сравнению с контрольной группой – в 3,1 раза для II группы и 5,3 раза для III группы соответственно ( $p < 0,05$ ). Введение аскорбиновой кислоты в IV и V группах статистически значимо снижало уровень ФНО- $\alpha$  по сравнению с группами облучения без лечения ( $p < 0,01$ ). В VI группе не было выявлено статистически значимых различий относительно контроля.

Интересно, что при анализе ИЛ-10 в крови, мы фиксировали компенсаторное увеличение концентраций цитокинов во всех группах; при этом наиболее значимый ответ по сравнению с группой контроля был обнаружен в группе III (в 3.2 раза,  $p < 0,05$ ). При этом, предлучевое введение аскорбиновой кислоты оказывало смягчающий эффект, статистически достоверно снижая уровень ИЛ-10 по сравнению с группами II и III ( $p < 0,01$ ). Группа моно-введения аскорбиновой кислоты не отличалась по сравнению с контрольной группой ( $p > 0,05$ ).

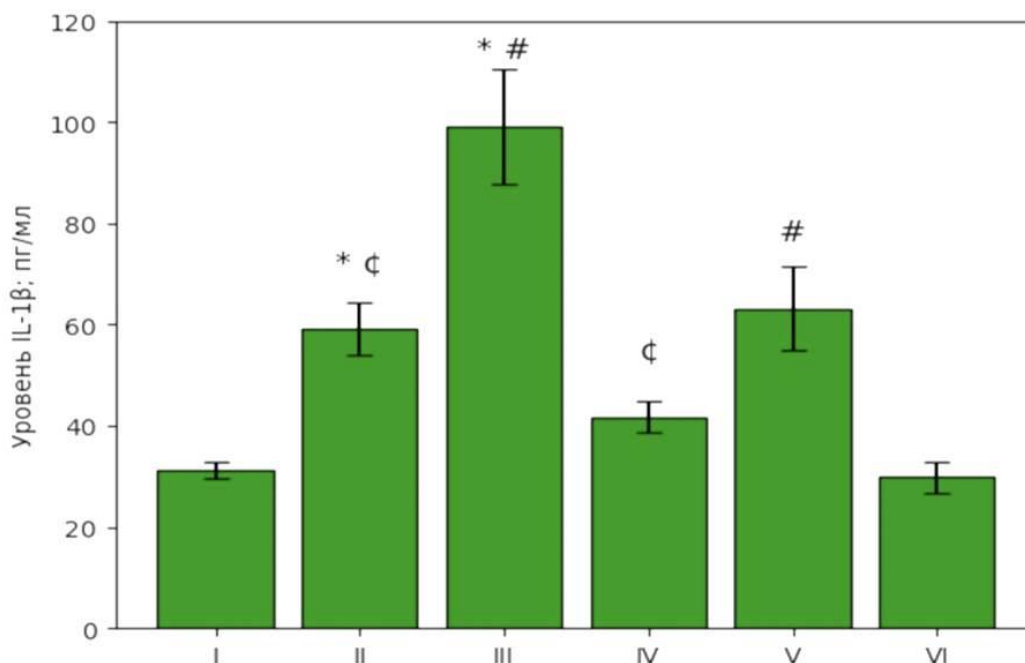


Рисунок 3.1 – Уровень ИЛ-1β в сыворотке крови на 7-е сутки после облучения электронами РОД 2 Гр или РОД 8 Гр и введения аскорбиновой кислоты. Экспериментальные группы пронумерованы согласно дизайну эксперимента. Достоверные различия по сравнению с контролем – \* ( $p < 0,05$ ); достоверные различия между II и IV группами – ϕ ( $p < 0,01$ ); достоверные различия между III и V группами – # ( $p < 0,01$ )

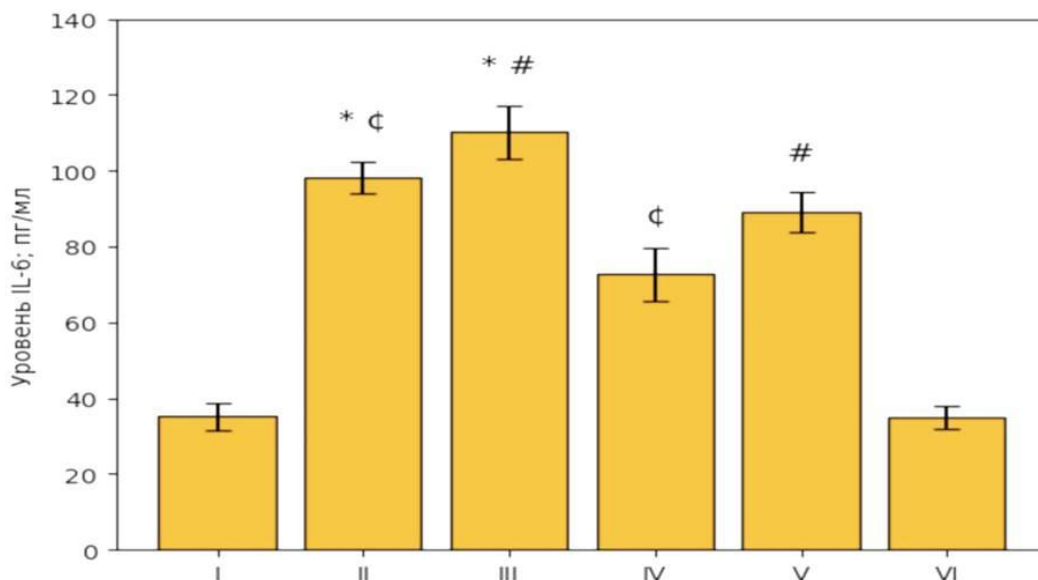


Рисунок 3.2 – Уровень ИЛ-6 в сыворотке крови на 7-е сутки после облучения электронами РОД 2 Гр или РОД 8 Гр и введения аскорбиновой кислоты. Экспериментальные группы пронумерованы согласно дизайну эксперимента. Достоверные различия по сравнению с контролем – \* ( $p < 0,05$ ); достоверные различия между II и IV группами – ϕ ( $p < 0,05$ ); достоверные различия между III и V группами – # ( $p < 0,01$ ).

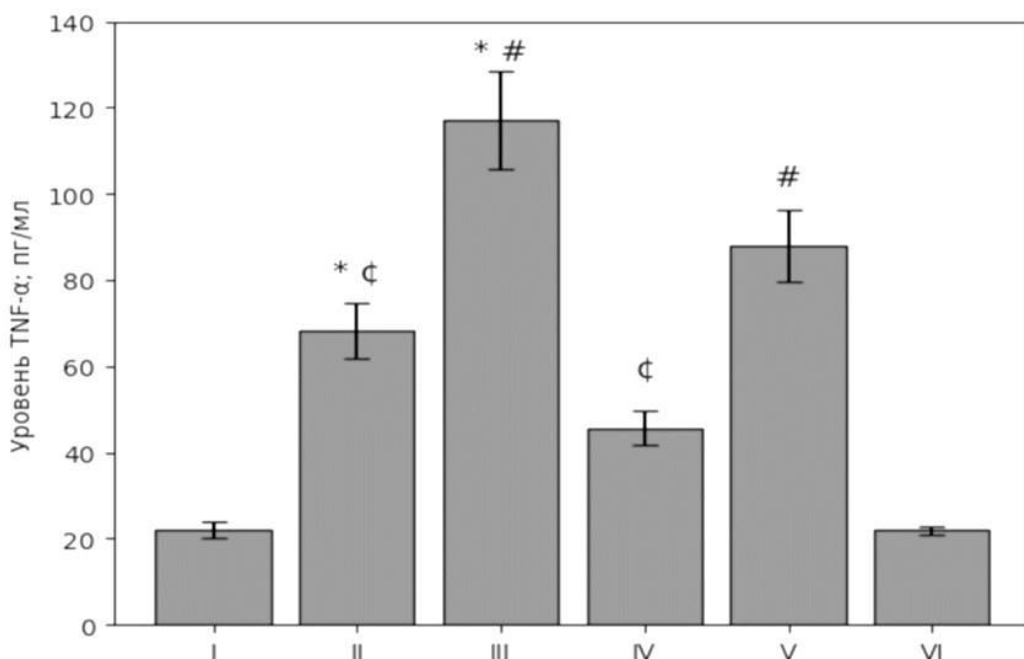


Рисунок 3.3 – Уровень ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови на 7-е сутки после облучения электронами РОД 2 Гр или РОД 8 Гр и введения аскорбиновой кислоты. Экспериментальные группы пронумерованы согласно дизайну эксперимента. Достоверные различия по сравнению с контролем – \* ( $p < 0,05$ ); достоверные различия между II и IV группами –  $\phi$  ( $p < 0,01$ ); достоверные различия между III и V группами – # ( $p < 0,01$ ).

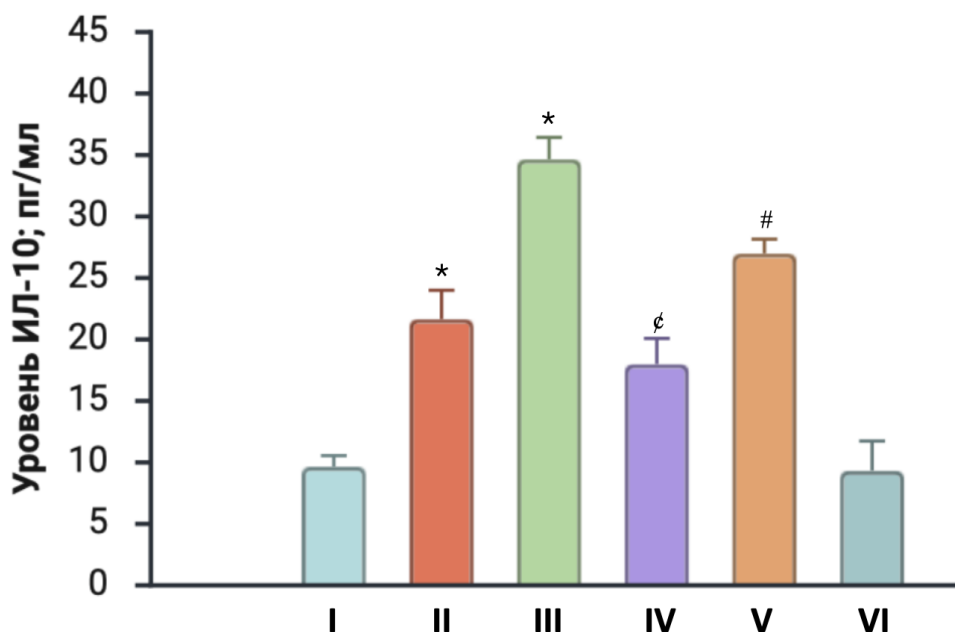


Рисунок 3.4 – Уровень ИЛ-10 в сыворотке крови на 7-е сутки после облучения электронами РОД 2 Гр или РОД 8 Гр и введения аскорбиновой кислоты. Экспериментальные группы пронумерованы согласно дизайну эксперимента. Достоверные различия по сравнению с контролем – \* ( $p < 0,05$ ); достоверные различия между II и IV группами –  $\phi$  ( $p < 0,01$ ); достоверные различия между III и V группами – # ( $p < 0,01$ ).

### 3.4. Гистологическое исследование

При световой микроскопии микропрепаратов почек крыс контрольной группы (интактные животные) наблюдали нормальную гистоархитектонику органа. Снаружи почка покрыта жировой и фиброзной капсулами, паренхима представлена корковым и мозговым веществом, содержащих лабиринты коры и мозговые лучи. В составе корковой дольки идентифицировались извитая и лучистая части. В мозговом веществе определялись элементы почечных пирамид. Согласно топографии, хорошо визуализировались субкапсулярные, корковые, промежуточные и юкстамедулярные нефроны. Почечные тельца (субкапсулярные, промежуточные, юкстамедулярные) содержали сосудистый полюс с приносящей и выносящей клубочковые артериолы и мочевой полюс, ориентированный в сторону почечных канальцев. Капсула клубочка образована наружным (с париетальными эпителиальными клетками) и внутренним – висцеральным (слой подоцитов – плоские клетки с вытянутым ядром) листками, а также полостью – мочевым пространством. Клубочек содержит клубочковую капиллярную сеть, эндотелий которой лежит на базальной мембране, общей в том числе для слоя подоцитов. В составе почечных канальцев четко определяются проксимальные канальцы, выстланные однослойным цилиндрическим эпителием, клетки которого формируют щеточную каемку на апикальной своей поверхности, а на базальной – базальнолатеральные инвагинации за счет обилия митохондрий. Петля нефрона и тонкий каналец образуют нисходящий и восходящий сегменты (где располагаются клетки 1-го, 2-го, 3-го и 4-го типов, но трудно идентифицируемые при световой микроскопии). Дистальные канальцы нефрона благодаря своей топографии содержат корковую и мозговую части; в некоторых зонах их эпителия, особенно возле почечных телец, определяется плотное пятно. Преимущественно в проекции мозгового вещества почки располагаются собирательные протоки (трубочки), в однослойном кубическом эпителии которых можно увидеть главные и вставочные клетки. Среди внутрпочечных кровеносных сосудов особенно можно выделить внутрдолевую и дуговую артерии,

приносящую и выносящую артериолы с клубочковой капиллярной сетью, прямые сосуды, дуговые сосуды. Стенка почечной лоханки состоит из слизистой (слои: уротелий, собственная пластинка), мышечной (внутренний продольный и наружный циркулярный слои гладкомышечных клеток) и адвентициальной оболочек (Рисунок 3.5). В микропрепаратах VI группы фиксировали нормальную гистологическую картину (Рисунок 3.6).

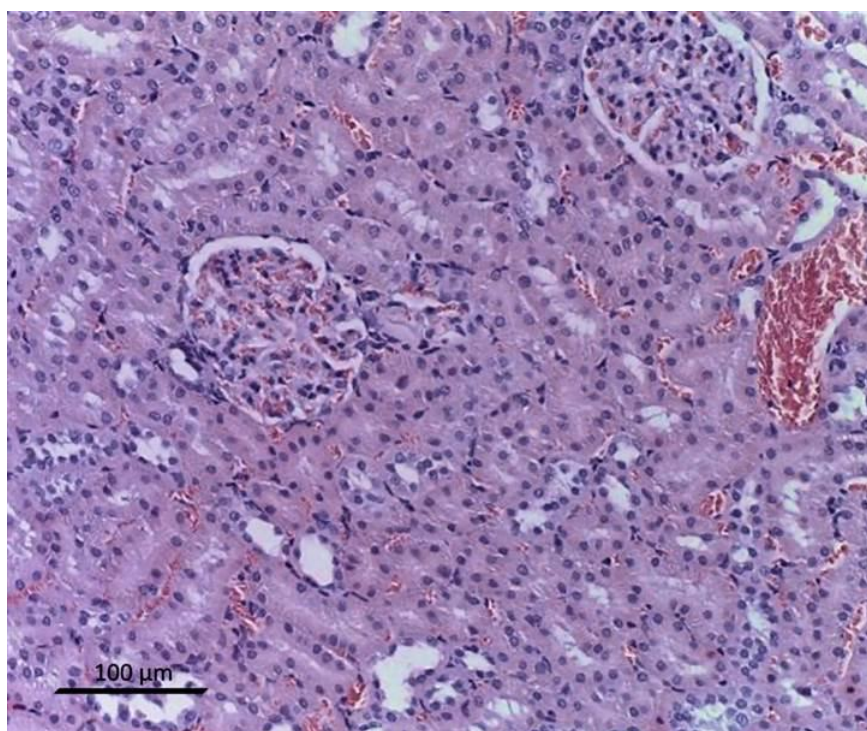


Рисунок 3.5 – Микропрепарат почки контрольной группы на 7-е сутки. Окраска: гематоксилин и эозин, увелич.  $\times 200$

Анализ образцов животных II и III групп наблюдали значительные морфологические изменения: уменьшение количества клубочков, расширение полости капсулы, дистрофические изменения и частичная атрофия эпителия отдельных канальцев нефрона, незначительный периваскулярный и парагломерулярный отек, клеточную воспалительную инфильтрацию интерстициальной ткани, обилие кровеносных сосудов (Рисунок 3.7., Рисунок 3.8). Эти изменения были особенно выражены в III группе, где площадь поражения

почки достигало 1/5 части органа, что указывает на высокую степень повреждения тканей под воздействием более высокой дозы облучения.

При предлучевом введении аскорбиновой кислоты животным IV и V групп степень выраженности патоморфологических изменений была меньше по сравнению с образцами почек II и III групп. Степень дистрофических изменений, вакуолизации эпителиоцитов и воспалительной реакции интерстициальной ткани была снижена, что указывает на частичную защиту от радиационного повреждения благодаря введению аскорбиновой кислоты (Рисунок 3.9, Рисунок 3.10). Величина поражения клубочков (тромботическая микроангиопатия, коллапс), канальцев нефрона и интерстициального компонента представлены в таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Морфологические изменения почки на 7-е сутки после облучения электронами в разных дозах и введения аскорбиновой кислоты

Группа	Воспаление	Атрофия	Вакуолизация	Дистрофия	Некроз
Контроль	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 1)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
РОД 2 Гр	1 (0 – 1) <sup>а</sup>	1 (0 – 1) <sup>а</sup>	1,5 (1 – 2) <sup>а</sup>	1,5 (1 – 2) <sup>а</sup>	0 (0 – 1) <sup>а</sup>
РОД 8 Гр	1,5 (1 – 2) <sup>б</sup>	3 (2 – 3) <sup>б</sup>	3 (2 – 3) <sup>б</sup>	3 (2 – 3) <sup>б</sup>	2 (2 – 3) <sup>б</sup>
РОД 2 Гр + АК	1 (0 – 1) <sup>В</sup>	1 (0 – 1) <sup>В</sup>	1 (0 – 1) <sup>В</sup>	1 (0 – 1) <sup>В</sup>	0 (0 – 1) <sup>В</sup>
РОД 8 Гр + АК	1 (0 – 1) <sup>Г</sup>	2 (2 – 2) <sup>Г</sup>	1,5 (1 – 2) <sup>Г</sup>	1,5 (1 – 2) <sup>Г</sup>	1 (1 – 2) <sup>Г</sup>
АК	0 (0 – 1)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)

Данные представлены как медиана (Me) и интерквартильный диапазон (25-й – 75-й перцентили). Морфологические изменения оценивались по балльной шкале: 0 – отсутствие изменений; 1 – легкие изменения; 2 – умеренные изменения; 3 – выраженные изменения. Статистически значимые различия между группами ( $p < 0,05$ ): <sup>а</sup> контроль и РОД 2 Гр (однократно); <sup>б</sup> контроль и РОД 8 Гр (однократно); <sup>В</sup> РОД 2 Гр + аскорбиновая кислота и РОД 2 Гр (однократно); <sup>Г</sup> РОД 8 Гр + аскорбиновая кислота и РОД 8 Гр (однократно).

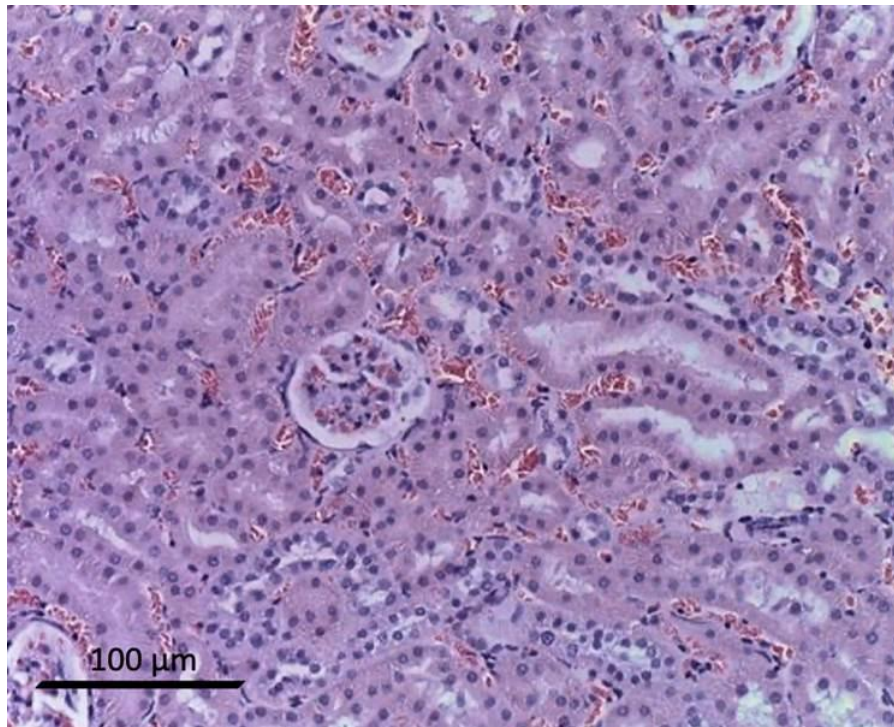


Рисунок 3.6 – Микропрепарат почки VI группы на 7-е сутки. Окраска: гематоксилин и эозин, увелич.  $\times 200$

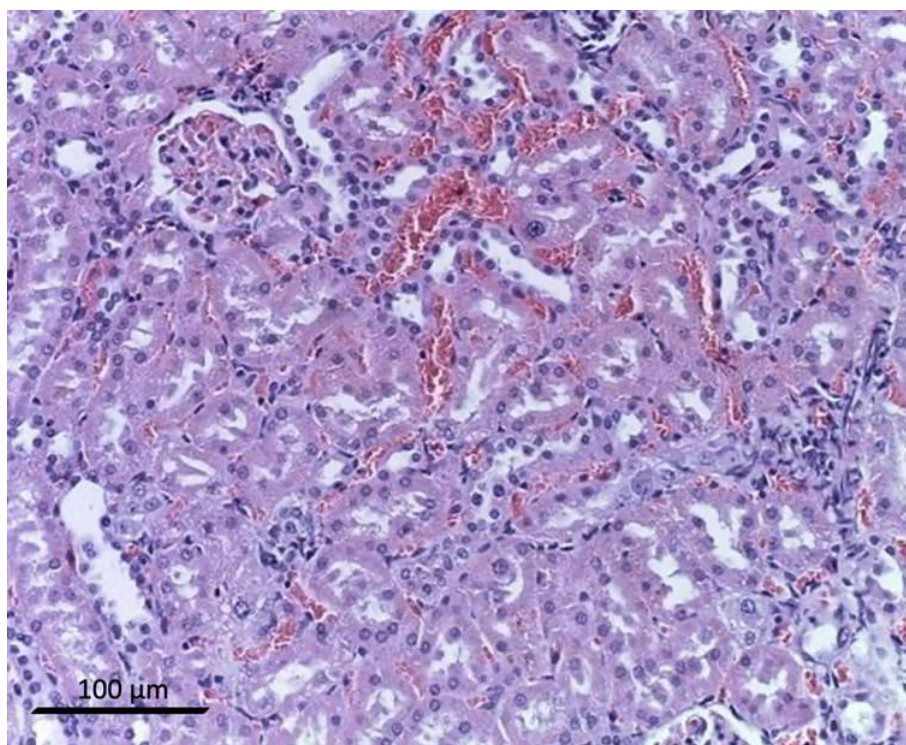


Рисунок 3.7 – Микропрепарат почки II группы на 7-е сутки. Окраска: гематоксилин и эозин, увелич.  $\times 200$

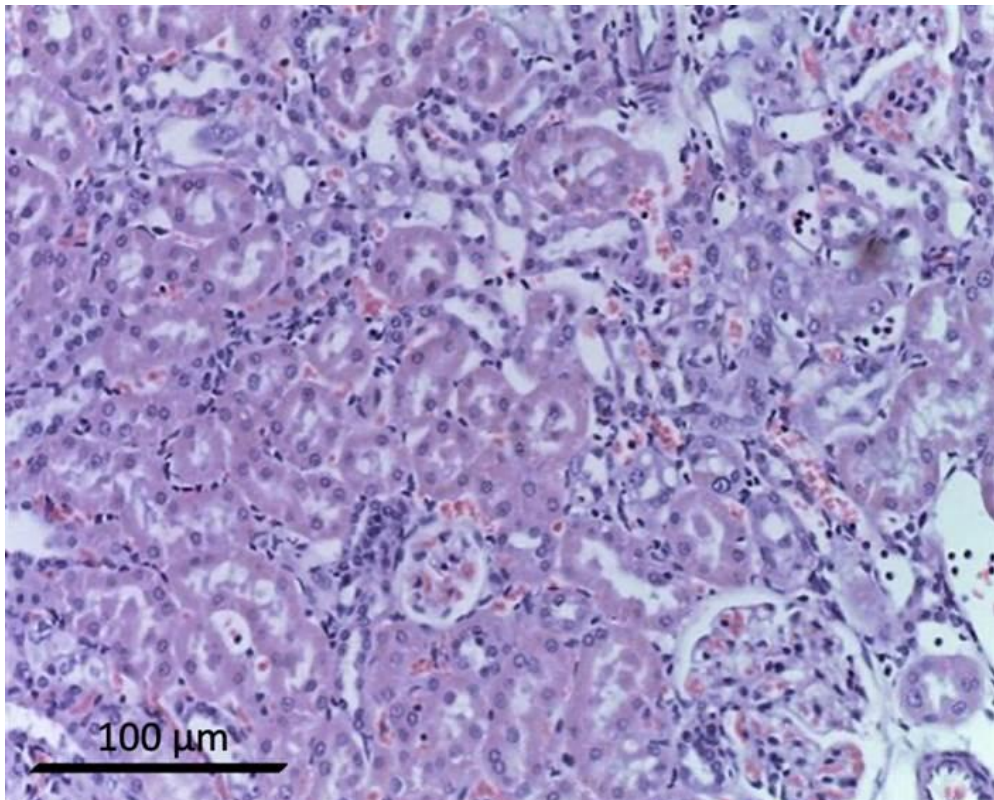


Рисунок 3.8 – Микропрепарат почки III группы на 7-е сутки. Окраска: гематоксилин и эозин, увелич.  $\times 200$

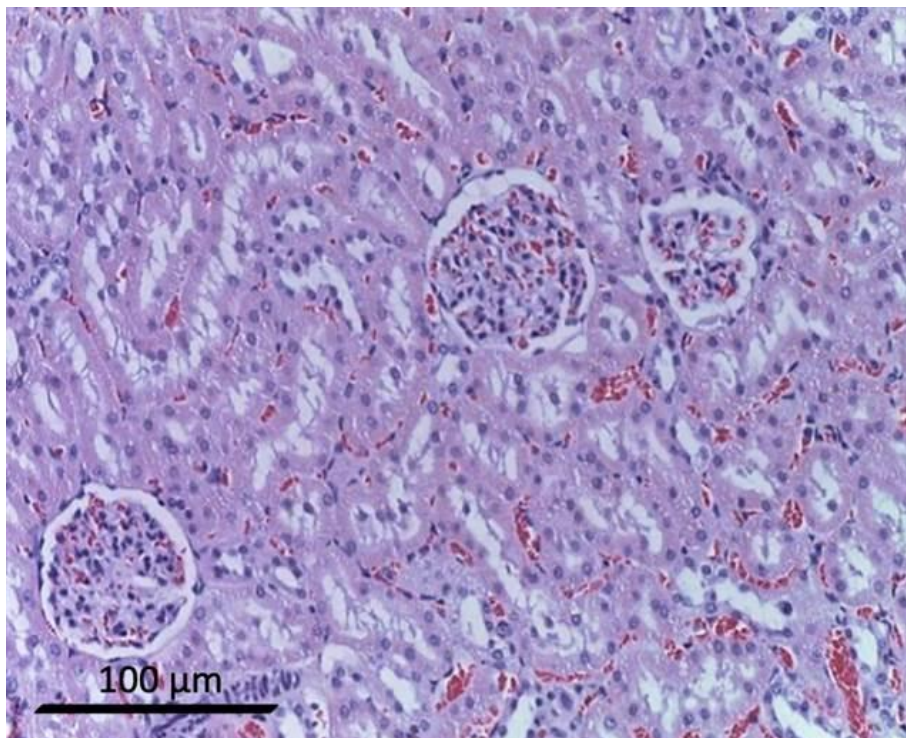


Рисунок 3.9 – Микропрепарат почки IV группы на 7-е сутки. Окраска: гематоксилин и эозин, увелич.  $\times 200$

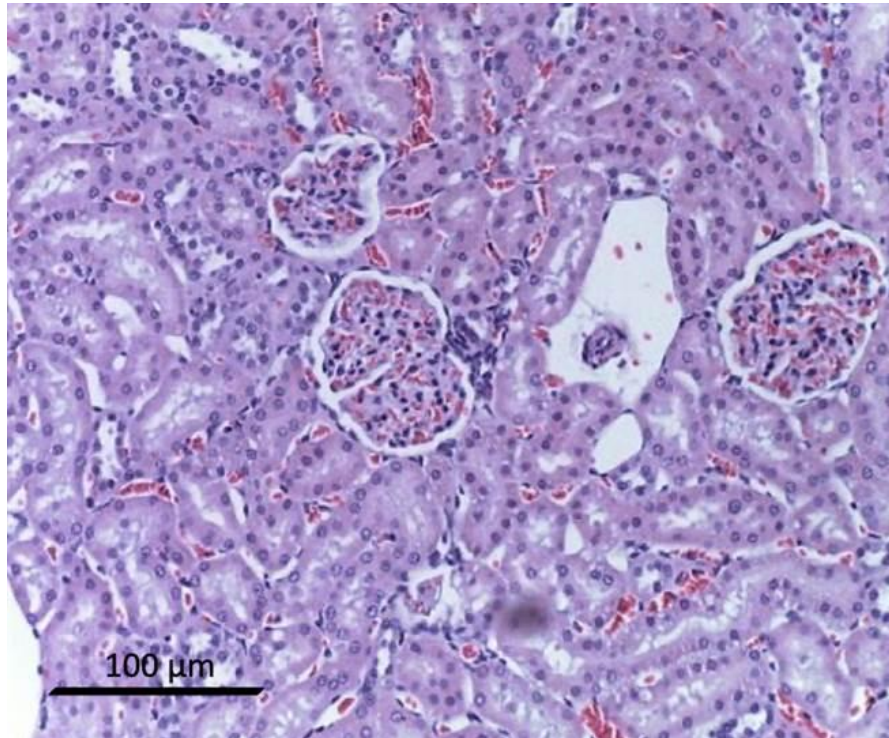


Рисунок 3.10 – Микропрепарат почки V группы на 7-е сутки. Окраска: гематоксилин и эозин, увелич.  $\times 200$

### 3.5. Гистохимическое исследование трихромом по Массону

При исследовании микропрепаратов почек контрольной группы и группы моно-введения аскорбиновой кислоты, окрашенных трихрома по Массону, не наблюдали каких-либо структурных изменений, в том числе признаков фиброзирования. Интактные почечные тельца и каналцы нейронов сохраняли четкие контуры, а окрашивание волокнистого компонента было минимальным, что соответствует нормальному состоянию (Рисунок 3.11, Рисунок 3.12).

В образцах II и III групп наблюдались начальные фибротические изменения. В частности, в группе, где животных подвергали облучению в дозе 8 Гр, отмечали умеренное разрастание коллагеновых волокон и вокруг почечных телец, а также вокруг каналцев нефронов. Эти изменения сопровождались небольшими очагами интерстициального отека и клеточной воспалительной инфильтрацией, что указывает на начальные признаки фиброзирования в ответ на радиационное

воздействие. Тем не менее, учитывая, что исследование проводилось на 7-е сутки после облучения электронами, фибротические изменения не достигли значительной степени выраженности (Рисунок 3.13, Рисунок 3.14).

В группах с предлучевым введением аскорбиновой кислоты (IV-ая и V-ая группы) степень выраженности фибротических изменений была существенно снижена по сравнению с группами моно-облучения (II-ая и III-я). Это проявлялось как в уменьшении количества коллагеновых волокон (окрашивание синего цвета в реакции трихромом по Массону), так и в снижении степени воспалительной инфильтрации и отека в интерстициальной ткани. Данные результаты подтверждают защитное действие аскорбиновой кислоты, которая способствует поддержанию нормальной гистоархитектоники почки и препятствует развитию выраженного фиброза, вызванного радиационным повреждением (Рисунок 3.15, Рисунок 3.16).

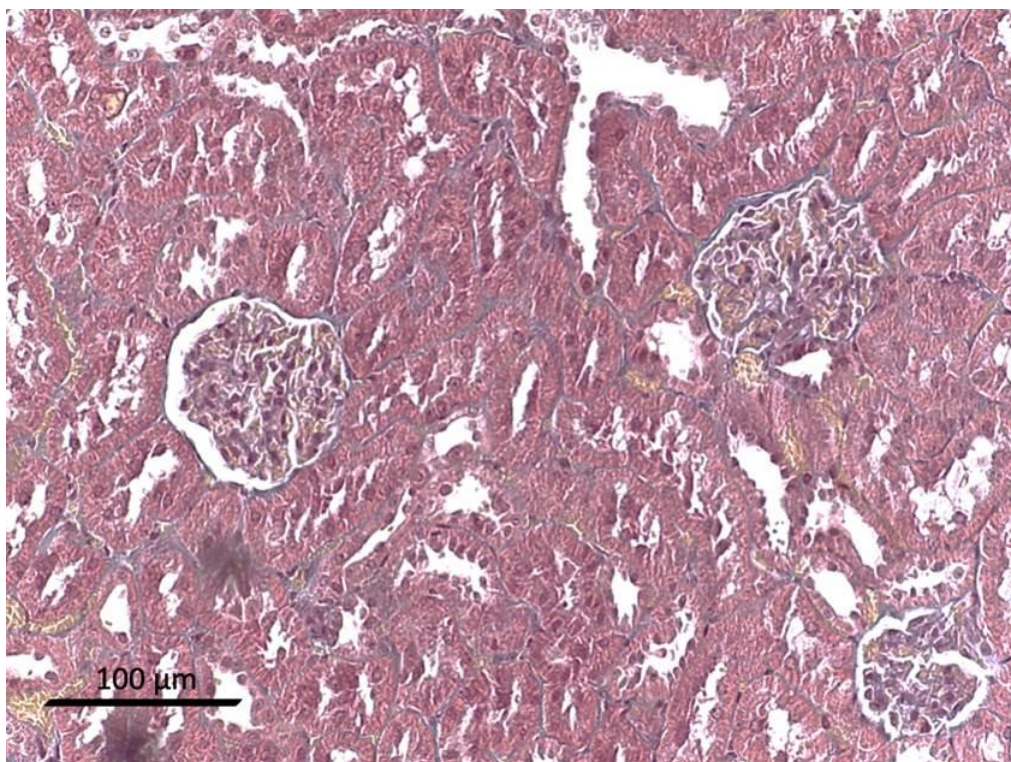


Рисунок 3.11 – Микропрепарат почки контрольной группы на 7-е сутки. Окраска: трихромом по Массону, увелич.  $\times 200$

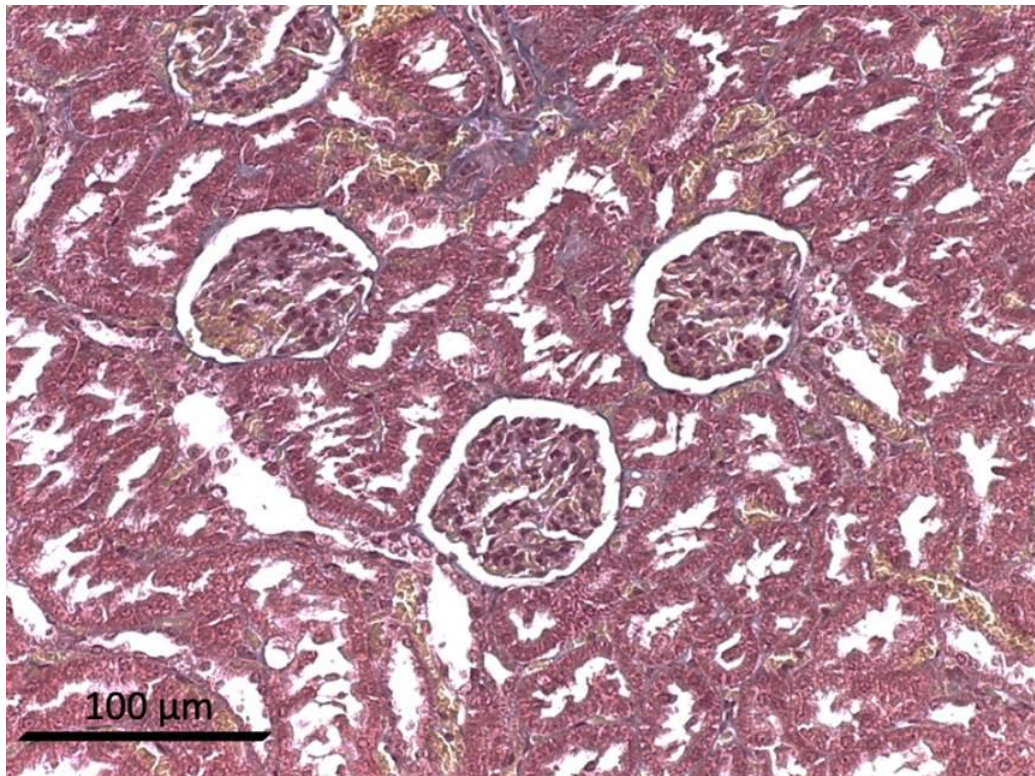


Рисунок 3.12 – Микропрепарат почки II группы на 7-е сутки. Окраска: трихромом по Массону, увелич.  $\times 200$

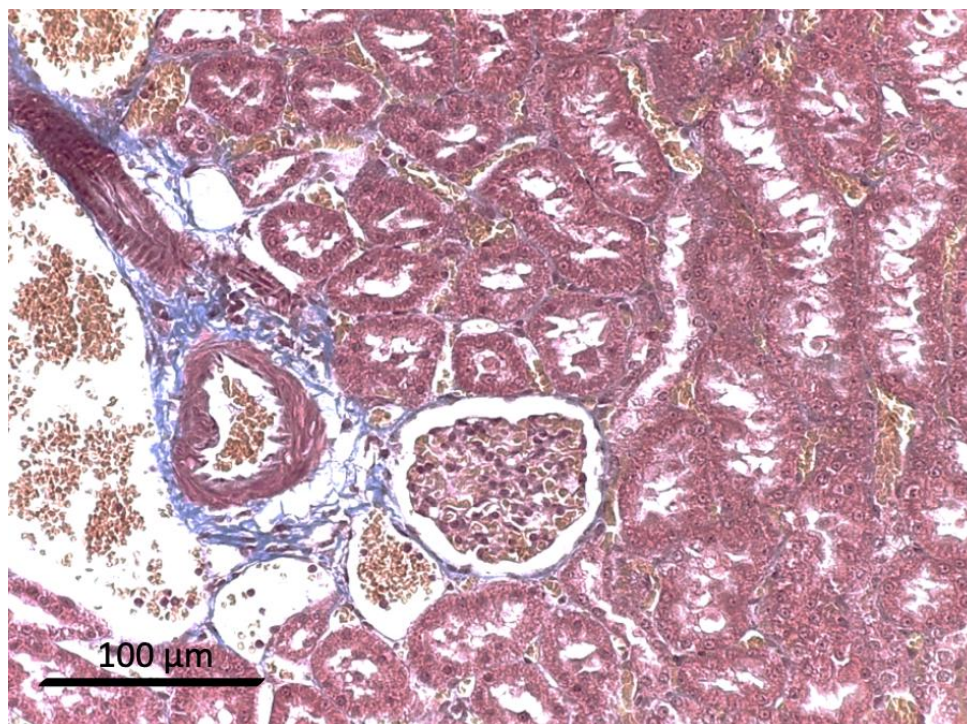


Рисунок 3.13 – Микропрепарат почки III группы на 7-е сутки. Окраска: трихромом по Массону, увелич.  $\times 200$

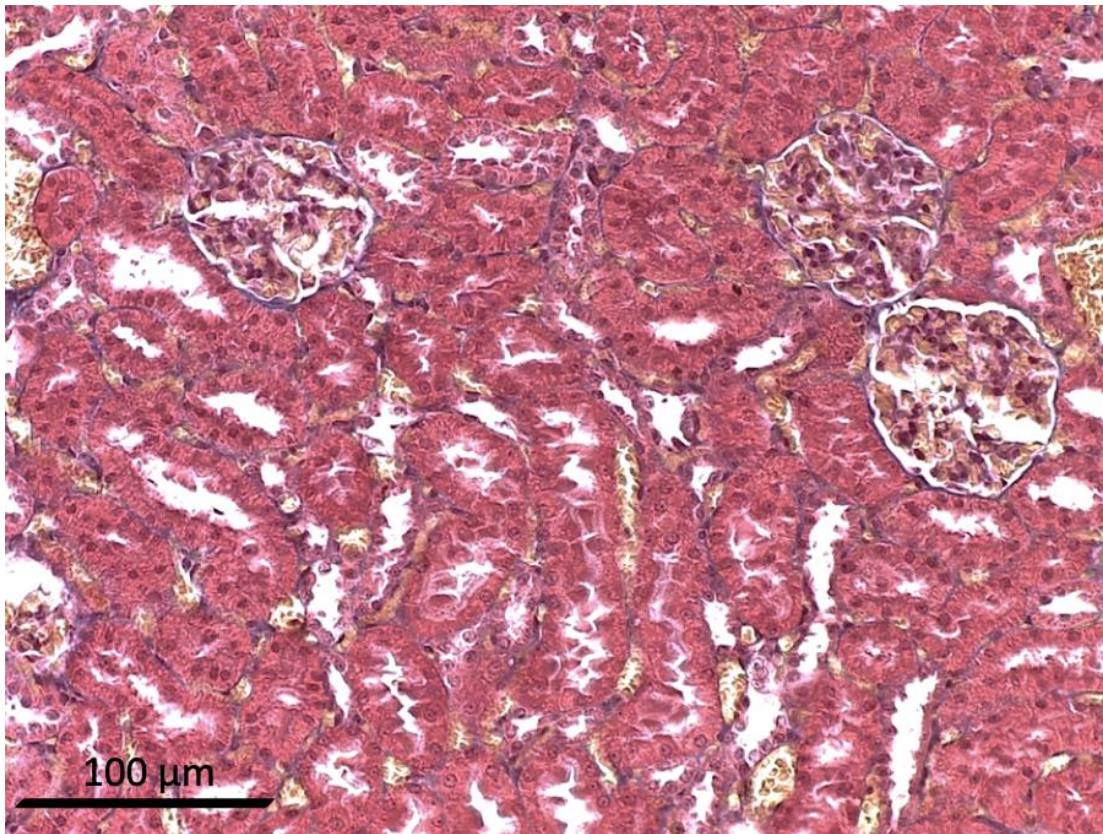


Рисунок 3.14 – Микропрепарат почки IV группы на 7-е сутки эксперимента. Окраска: трихромом по Массону, увелич.  $\times 200$

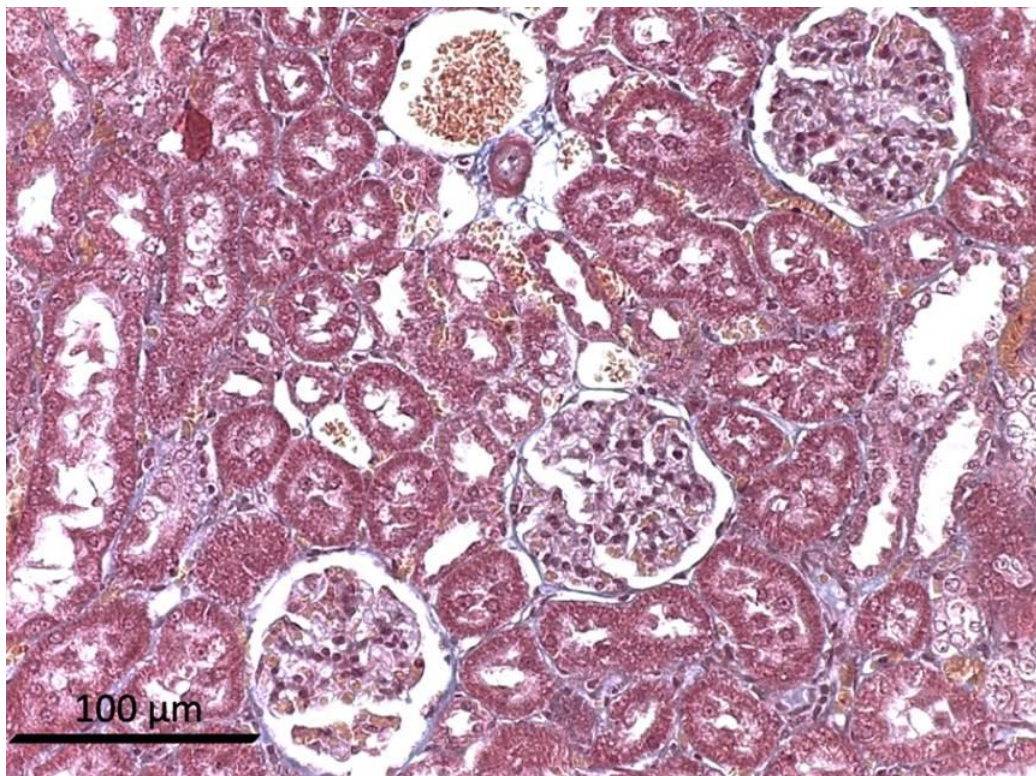


Рисунок 3.15 – Микропрепарат почки V группы на 7-е сутки. Окраска: трихромом по Массону, увелич.  $\times 200$

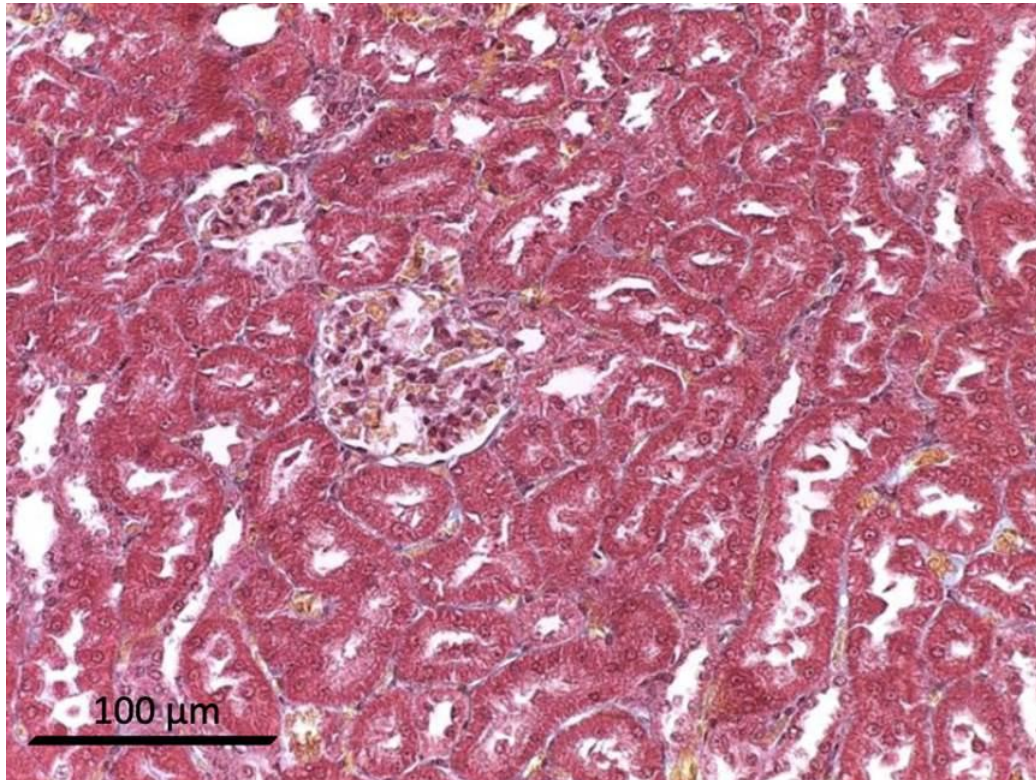


Рисунок 3.16 – Микропрепарат почки VI группы на 7-е сутки. Окраска: трихромом по Массону, увелич.  $\times 200$

### **3.6. Иммуногистохимическое исследование**

#### **3.6.1. Иммуногистохимическая оценка пролиферативно-апоптотического баланса в структурах почки после локального облучения электронами и при введении аскорбиновой кислоты**

В контексте исследования механизмов регуляции клеточного цикла, ключевым фактором которого является синтез ДНК, была выполнена оценка пролиферативной активности клеток по выработке маркера Ki-67. Иммуногистохимическое окрашивание выявляло специфическое ядерное окрашивание в почечных тельцах (эндотелиоциты, подоциты, мезангиоциты), эпителиоцитах канальцев нефронов и собирательных протоках.

В микропрепаратах почек II и III групп обнаружили значительное уменьшение количества Ki-67-позитивных эпителиоцитов в проксимальных и дистальных канальцах нефронов (Рисунок 3.17).

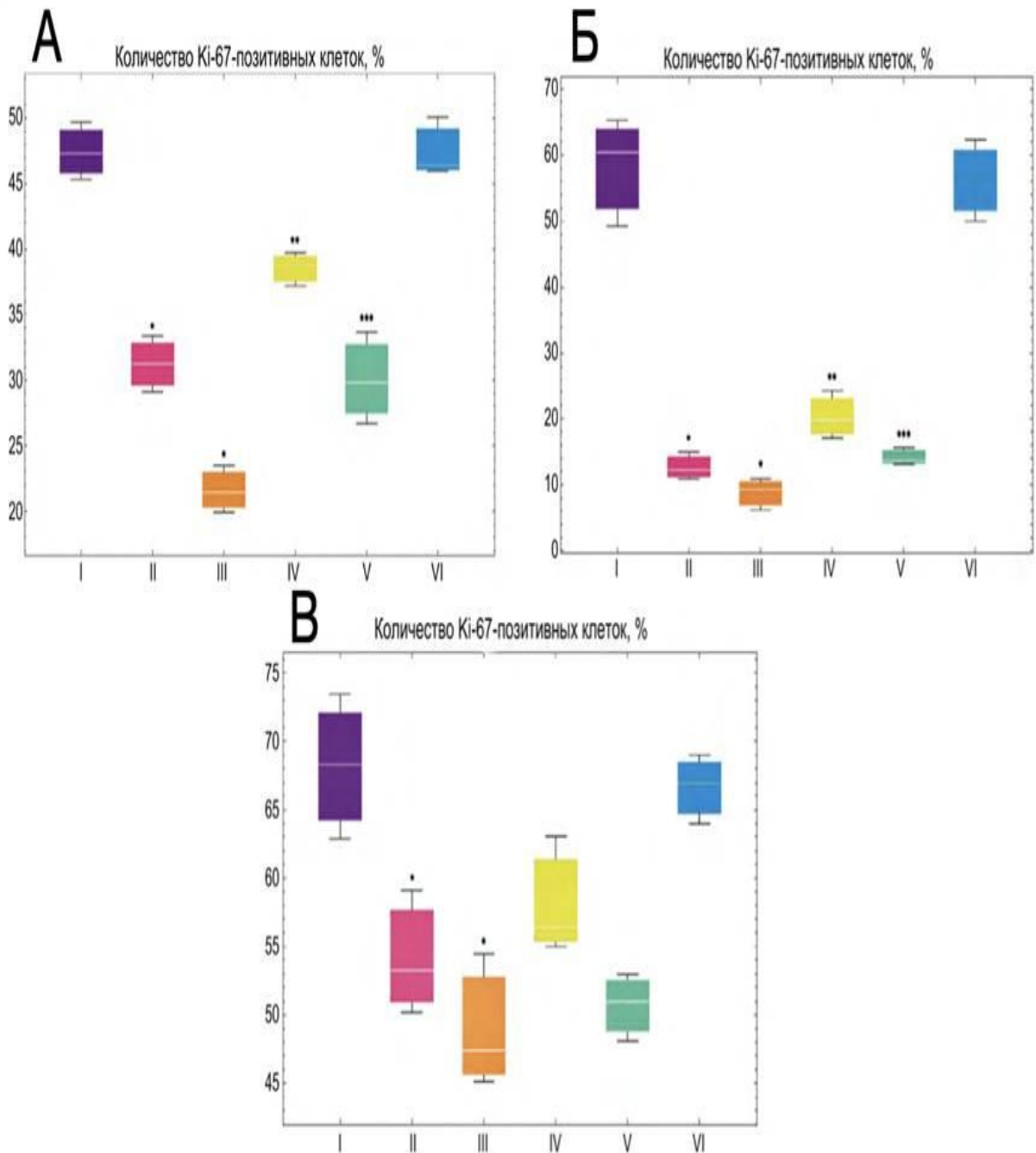


Рисунок 3.17 – Количество Ki-67-позитивных клеток в структуре почки контрольной и опытных групп на 7-е сутки после облучения электронами в разных дозах и введения аскорбиновой кислоты. Группы пронумерованы в соответствии с дизайном исследования. Количество Ki-67-позитивных клеток в: А – клубочках; Б – проксимальных и дистальных канальцах нефронов; В – канальцах петли нефрона и собирательных протоках. Достоверные различия по сравнению с контролем – \* ( $p < 0,05$ ); достоверные различия между II и IV группами – \*\* ( $p < 0,01$ ); достоверные различия между III и V группами – \*\*\* ( $p < 0,01$ ).

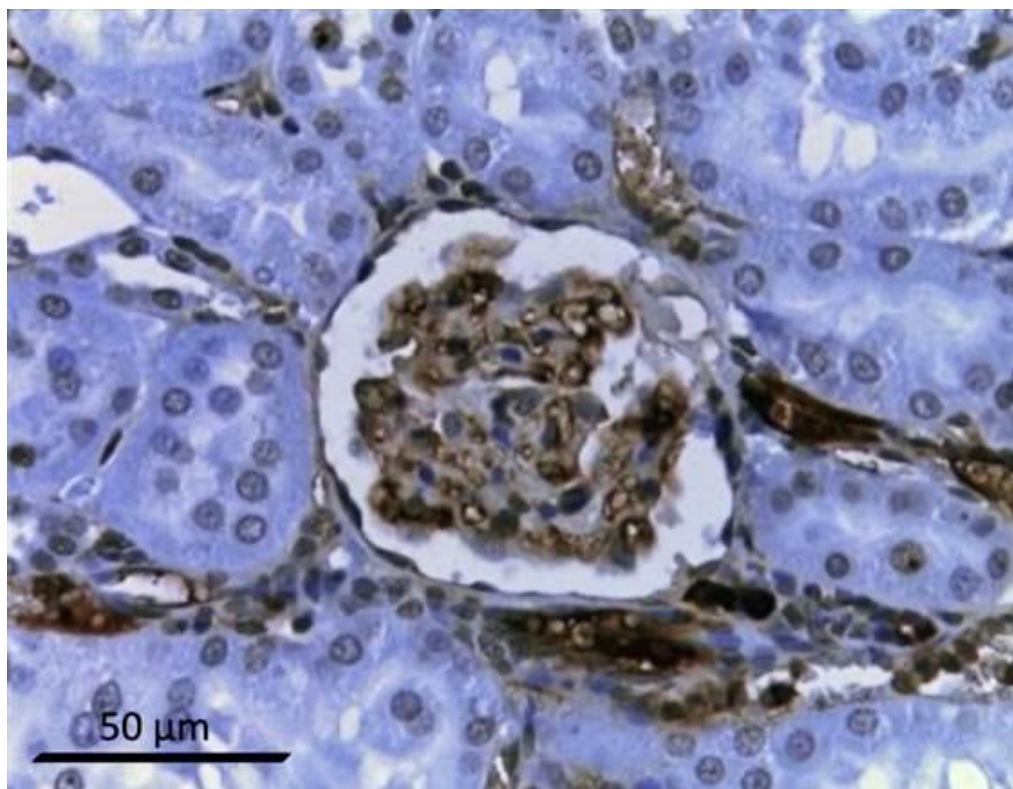


Рисунок 3.18 – Микропрепарат почки контрольной группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki-67; докрасивание ядер – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

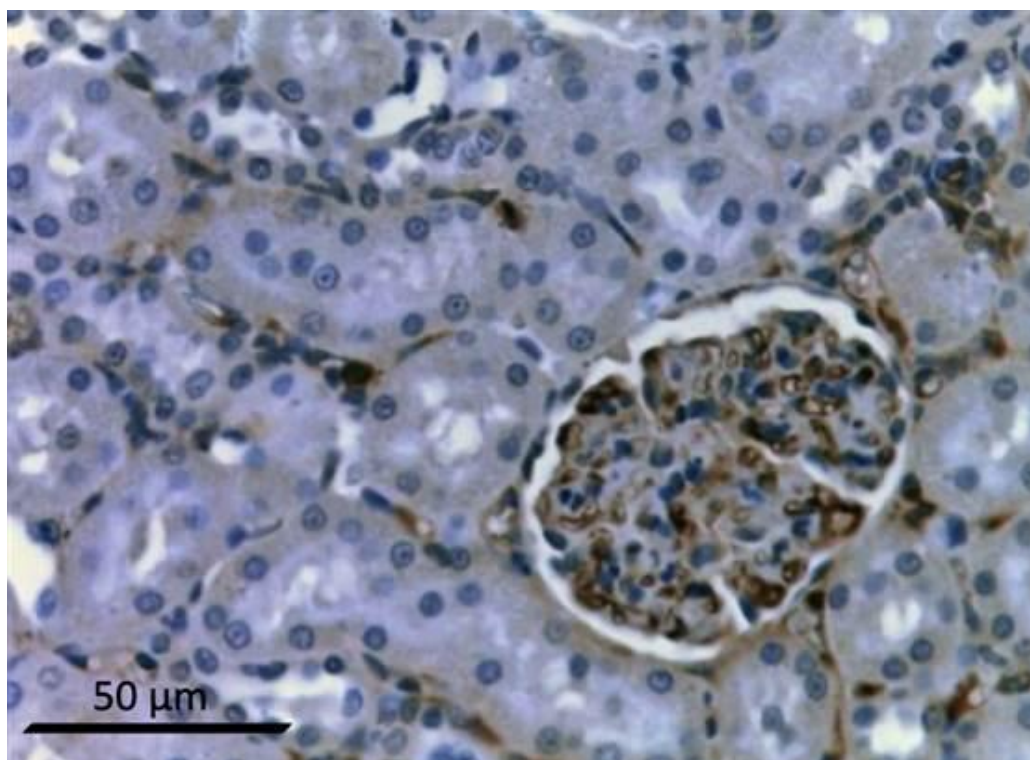


Рисунок 3.19 – Микропрепарат почки II на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki-67; докрасивание ядер – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

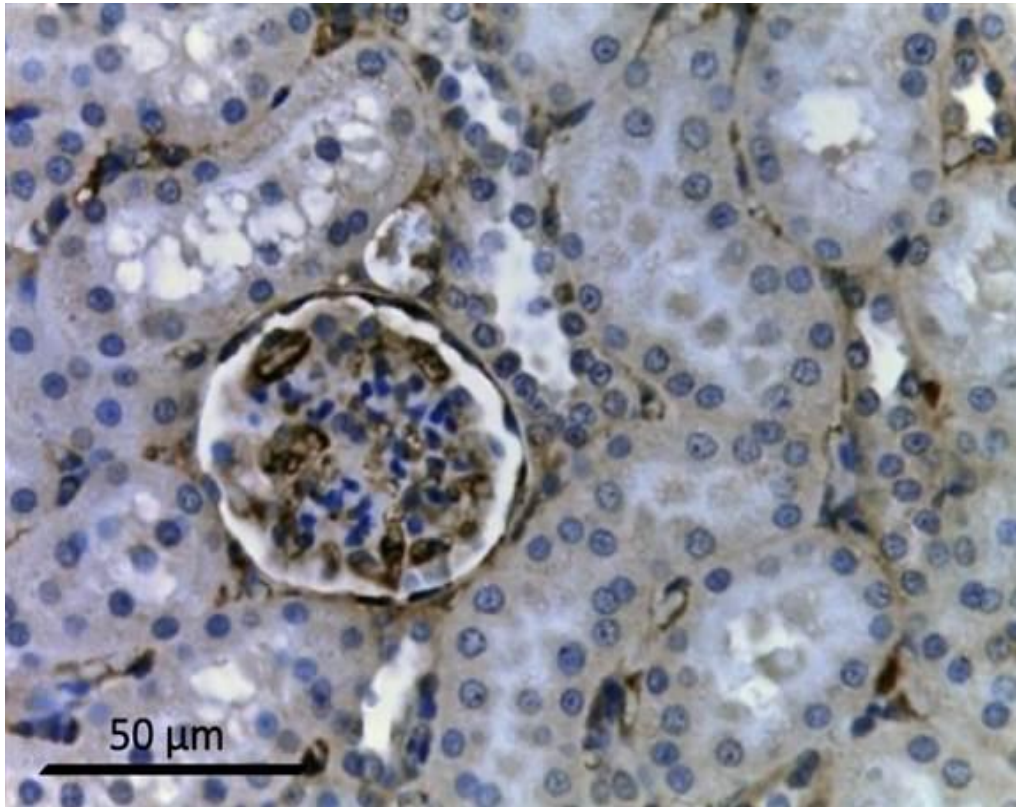


Рисунок 3.20 – Микропрепарат почки III на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki-67; докрасивание ядер – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

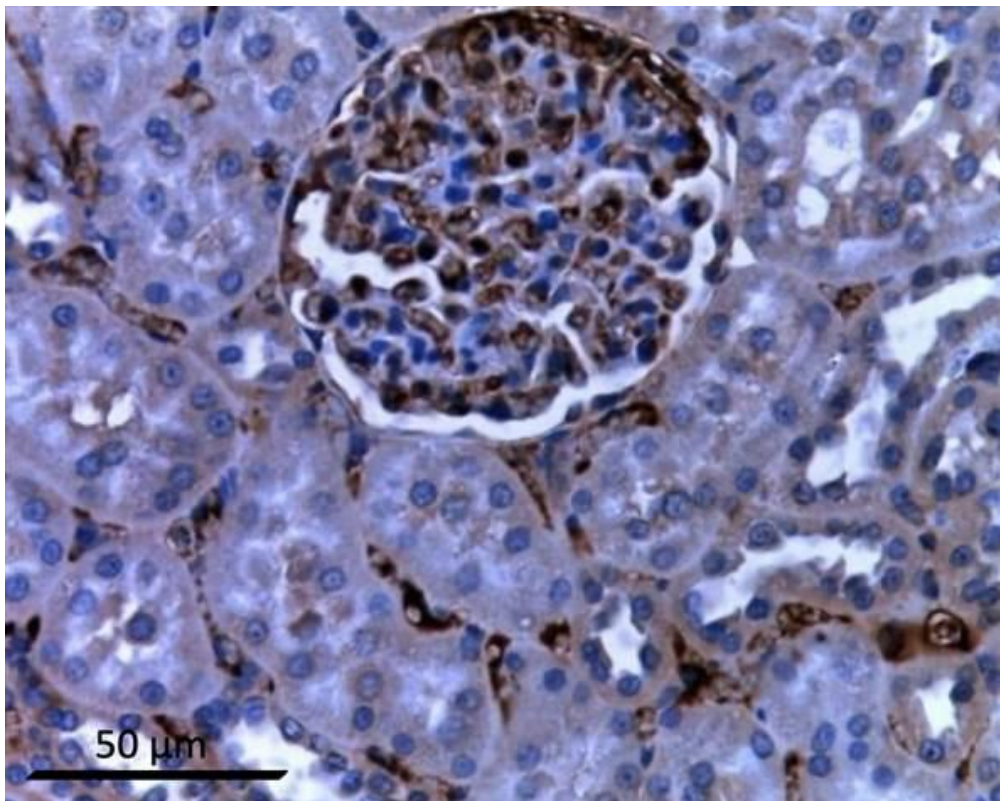


Рисунок 3.21 – Микропрепарат почки IV-ей на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki-67; докрасивание ядер – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

Также наблюдали незначительное снижение числа Ki-67-позитивных клеток в клубочках, преимущественно в эндотелиоцитах клубочковой капиллярной сети, по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ). В то же время, доля Ki-67-позитивных нефроцитов в петле нефрона и собирательных протоках практически не отличалась от контрольных значений (Рисунок 3.17, Рисунок 3.18, Рисунок 3.19, Рисунок 3.20).

При предлучевом введении аскорбиновой кислоты в IV и V группах наблюдали незначительное увеличение количества Ki-67-позитивных клеток в изучаемых структурах почки (эндотелии, подоцитах, мезангиоцитах и эпителиоцитах канальцев нефронов) по сравнению со II и III группами. Однако при сравнении количества Ki-67-позитивных клеток в петле нефрона и собирательных протоках между группами предлучевого введения аскорбиновой кислоты и монооблучения статистически значимых различий не наблюдали (Рисунок 3.21, Рисунок 3.22).

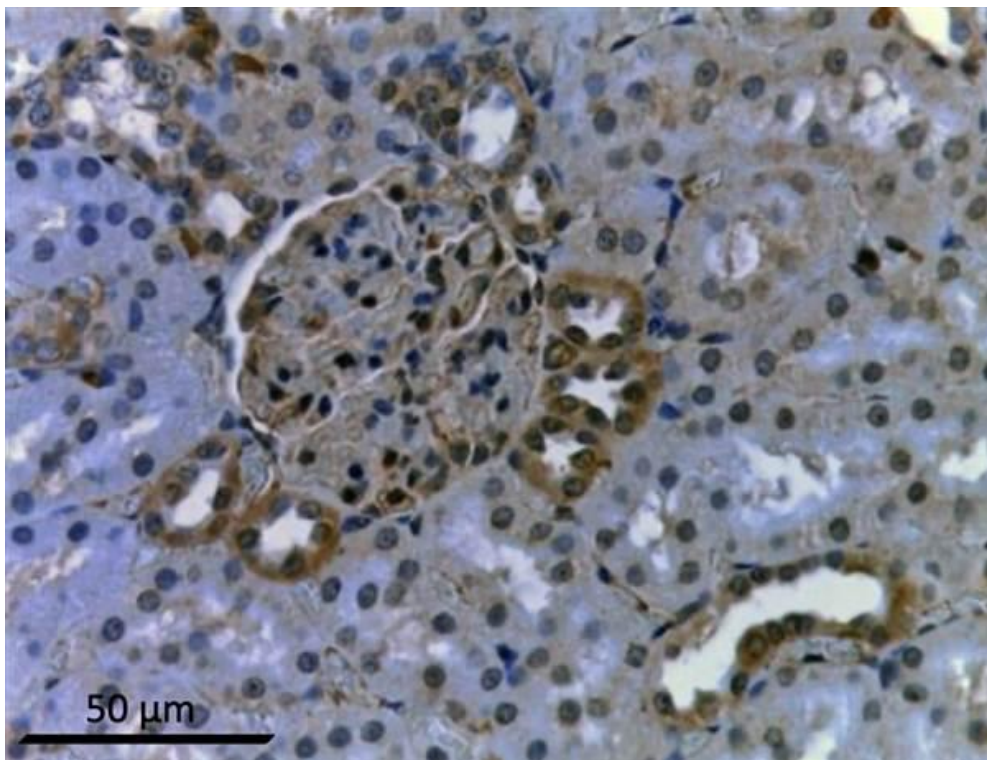


Рисунок 3.22 – Микропрепараты почки V на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki-67; докрашивание ядер – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

В VI группе статистически значимых различий в распределении Ki-67-позитивных клеток в клубочках, канальцах нефрона и собирательных протоках не было выявлено относительно группы контроля (Рисунок 3.23).

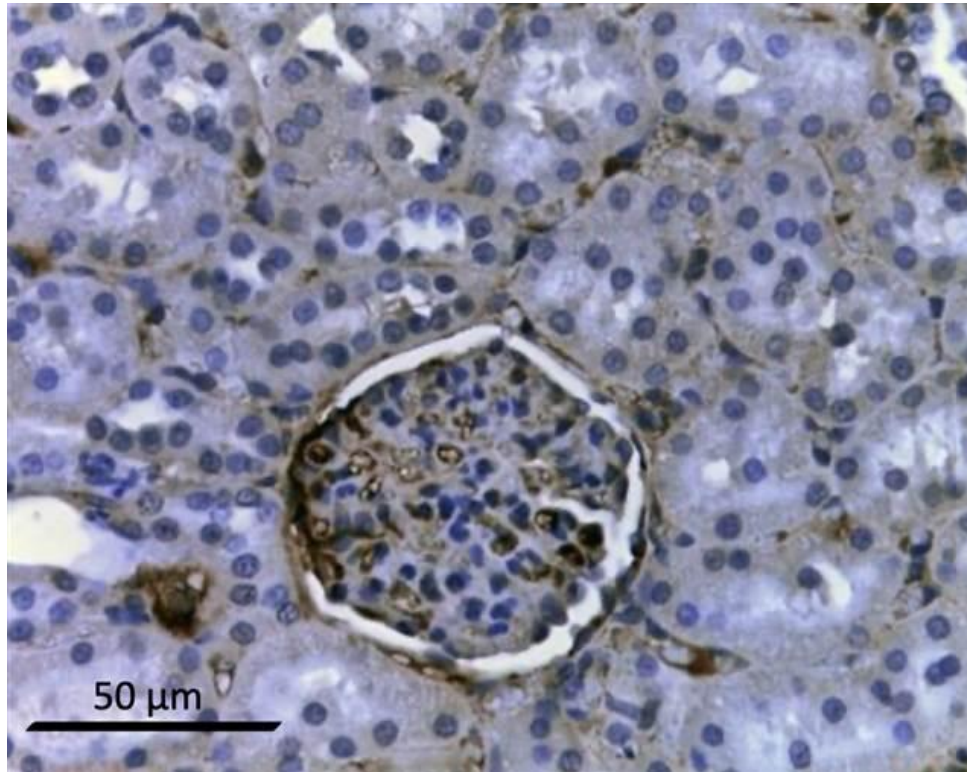


Рисунок 3.23 – Микропрепарат почки VI на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki-67; докрасивание ядер – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

При иммуногистохимическом исследовании почек для оценки уровня терминальной стадии апоптоза определяли каспаза-3-позитивные клетки в клубочках (эндотелиоциты, подоциты, мезангиоциты), а также в эпителиоцитах канальцев нефронов и собирательных протоках. Распределение каспаза-3-позитивных клеток варьировало в зависимости от экспериментальной группы и локализации изучаемых структур (Рисунок 3.24).

В микропрепаратах почек животных II и III групп обнаружили значительное увеличение количества каспаза-3-позитивных эпителиоцитов в проксимальных и дистальных канальцах нефронов, а также в эндотелии клубочковой капиллярной сети по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ). Подоциты висцерального листка капсулы оставались каспаза-3-негативными. Доля каспаза-3-позитивных

клеток в эпителии петли нефрона и собирательных протоках также была повышена, особенно в образцах III группы (Рисунок 3.25, Рисунок 3.26, Рисунок 3.27).

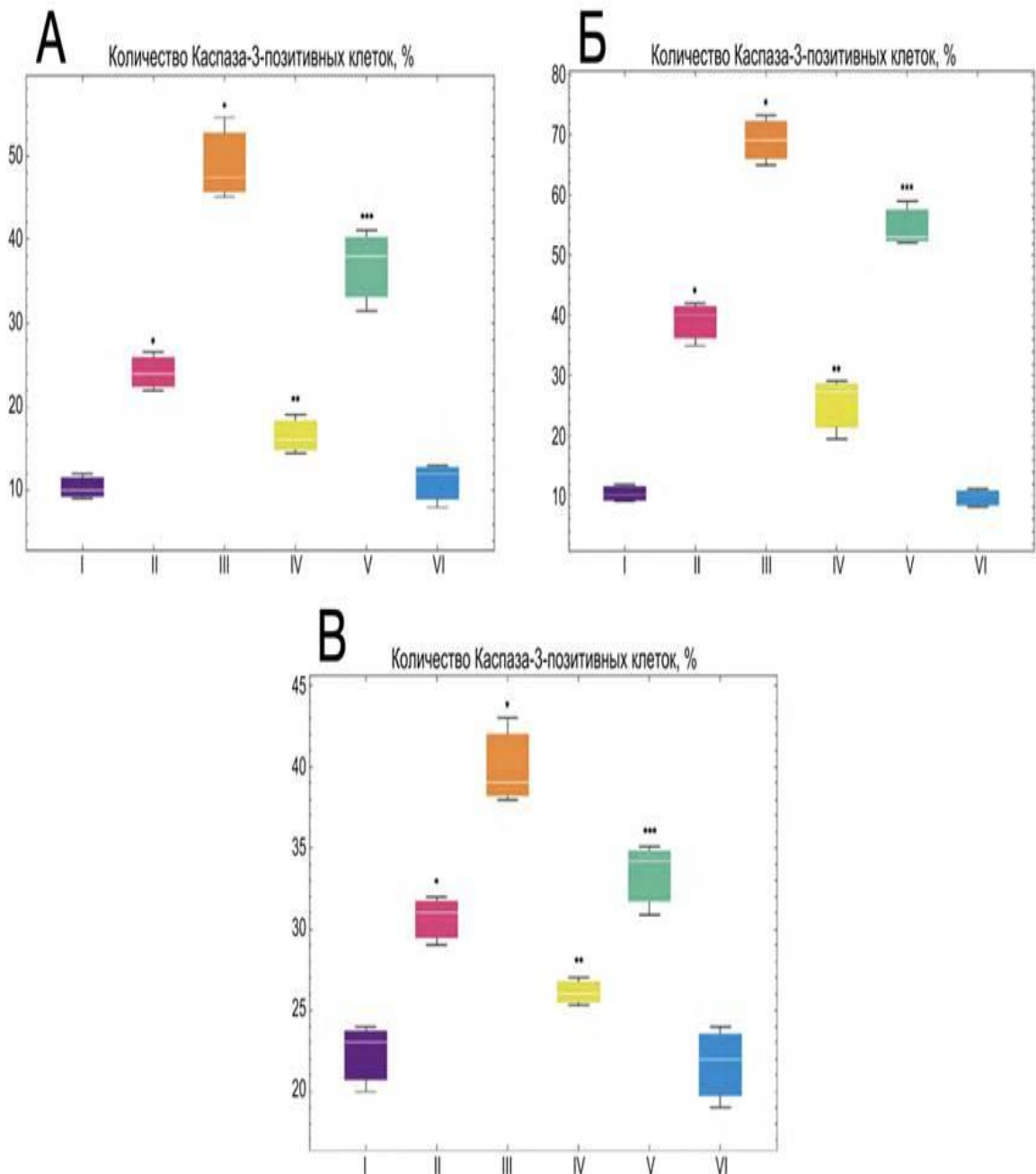


Рисунок 3.24 – Количество каспаза-3-позитивных клеток в структурах почки контрольной и опытных групп на 7-е сутки после облучения электронами в разных дозах и введения аскорбиновой кислоты. Группы пронумерованы в соответствии с дизайном исследования. Количество каспаза-3-позитивных клеток в: А – клубочках; Б – проксимальных и дистальных канальцах нефронов; В – петле нефрона и собирательных протоках. Достоверные различия по сравнению с контролем – \* ( $p < 0,05$ ); достоверные различия между II и IV группами – \*\* ( $p < 0,01$ ); достоверные различия между III и V группами – \*\*\* ( $p < 0,01$ ).

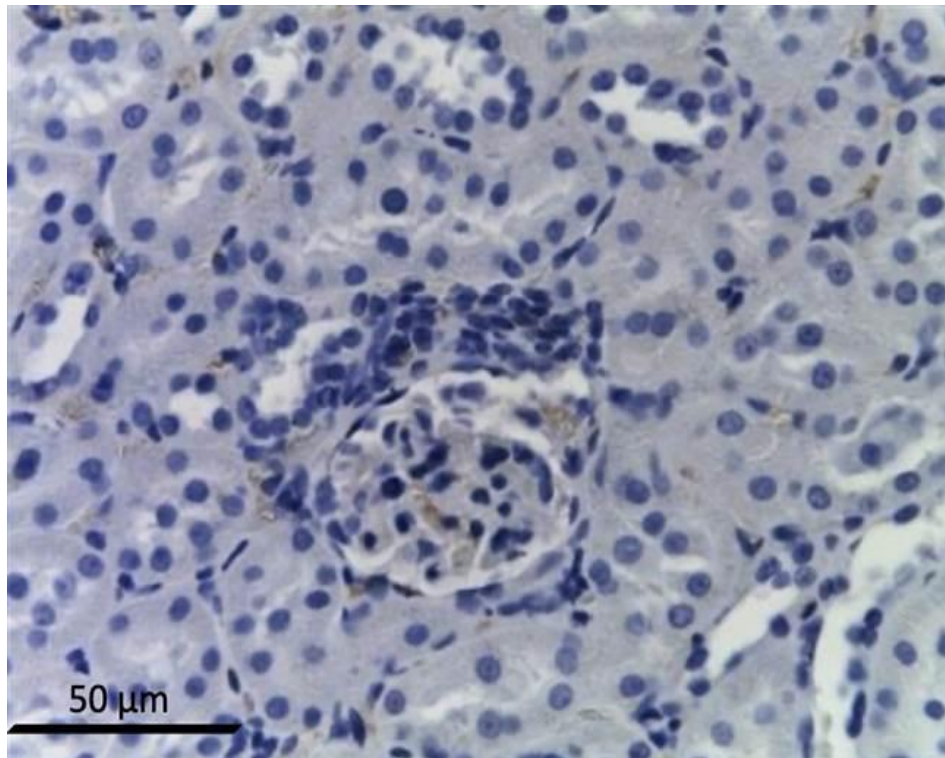


Рисунок 3.25 – Микропрепараты почки контрольной группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к каспазе-3; докрасивание ядер – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

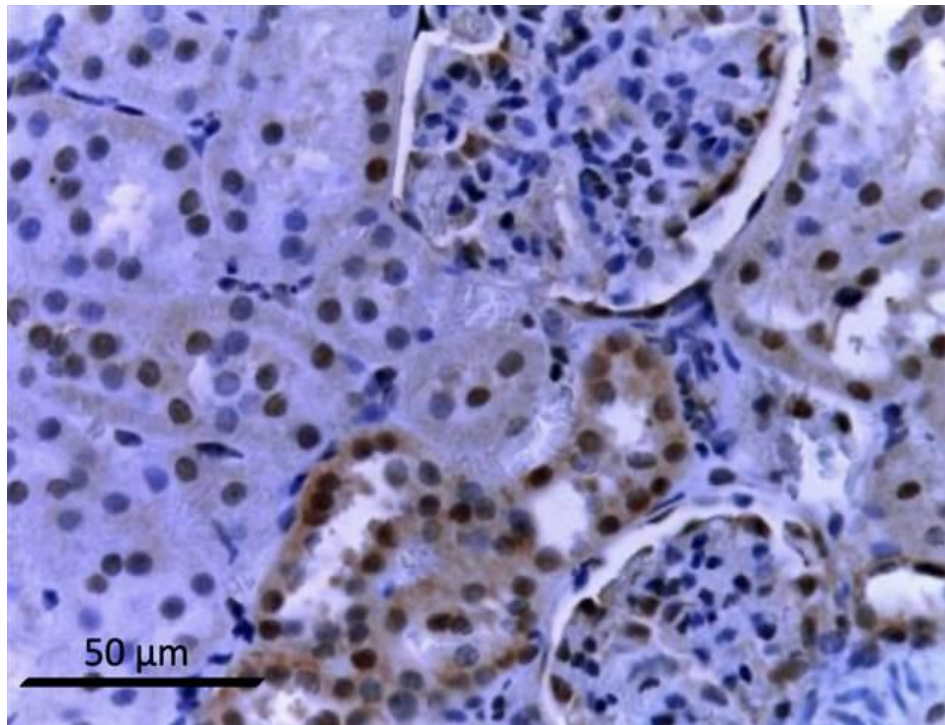


Рисунок 3.26 – Микропрепараты почки II группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к каспазе-3; докрасивание ядер – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

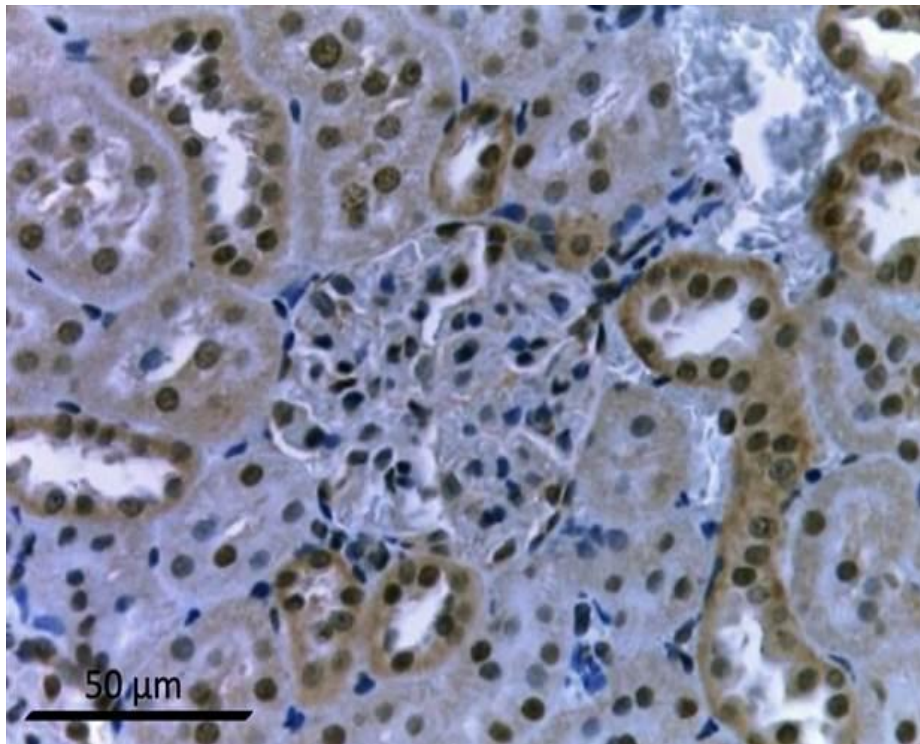


Рисунок 3.27 – Микропрепараты почки III группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к каспазе-3; докрасивание ядер – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

В IV и V группах фиксировали статистически значимое снижение количества каспаза-3-позитивных клеток в изучаемых структурах почек по сравнению со II и III группами ( $p < 0,05$ ). При сравнении количества каспаза-3-позитивных клеток в эпителии петли нефрона и собирательных протоках между группами предлучевого введения аскорбиновой кислоты и монооблучения также были обнаружены статистически значимые различия при  $p < 0,05$  (Рисунок 3.28, Рисунок 3.29).

В VI группе изменений в уровне экспрессии каспазы-3 по сравнению с контрольной группой не было выявлено (Рисунок 3.30).

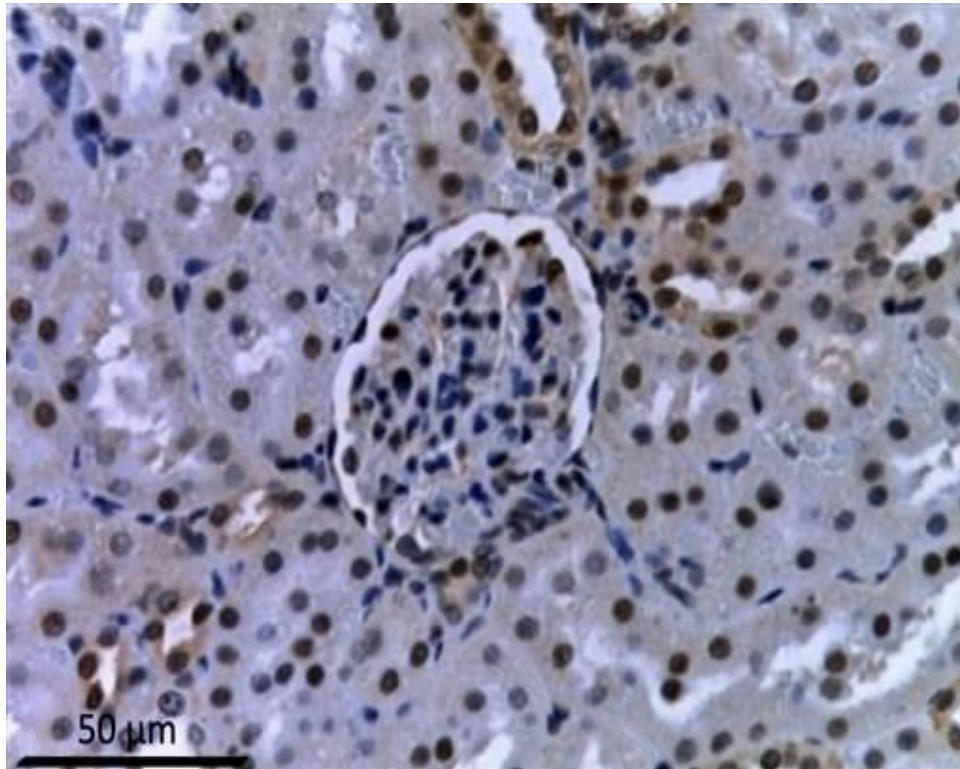


Рисунок 3.28 – Микропрепараты почки IV группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к каспазе-3; докрасивание ядер – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

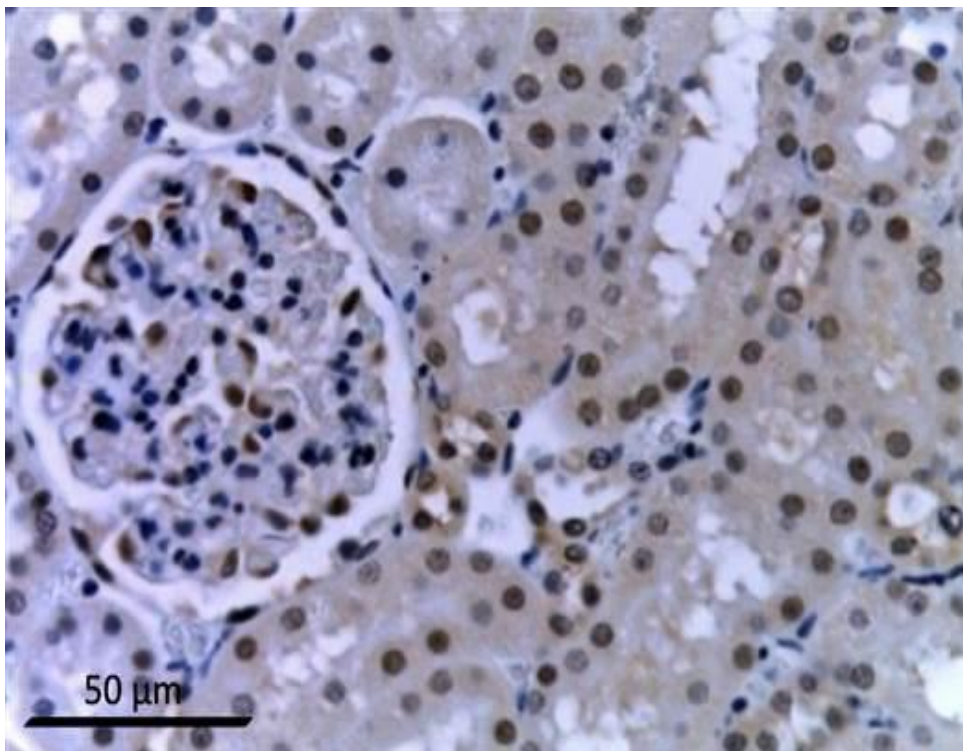


Рисунок 3.29 – Микропрепараты почки V группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к каспазе-3; докрасивание ядер – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

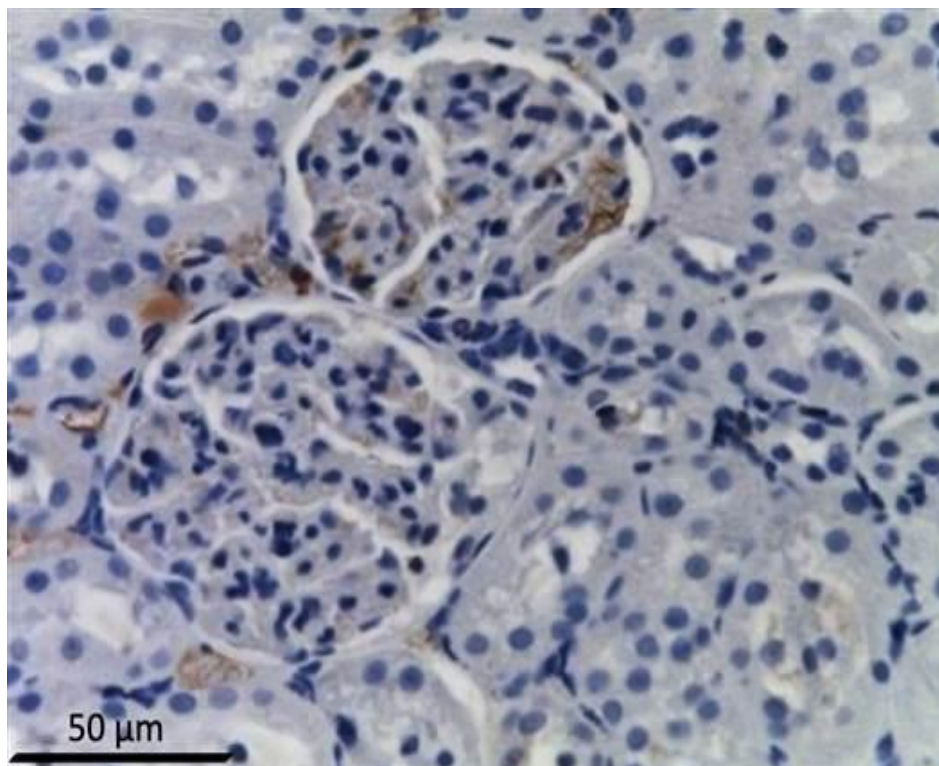


Рисунок 3.30 – Микропрепараты почки VI группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к каспазе-3; докрашивание ядер – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

Таким образом, результаты иммуногистохимического анализа демонстрировали распределение Ki-67- и каспаза-3-позитивных клеток в клубочках, эпителиоцитах проксимальных и дистальных канальцах нефронов после облучения электронами: В III группе была зафиксирована активация терминальной стадии клеточной гибели, что коррелировало с дозой облучения. В то же время, предлучевое введение аскорбиновой кислотой привело к достоверному снижению уровня апоптоза.

### **3.6.2. TUNEL исследование почки после локального облучения электронами и при введении аскорбиновой кислоты**

В рамках анализа апоптоза, вследствие фрагментации ДНК, в структурах почки в ответ на локальное облучение электронами проведен TUNEL анализ. Окрашивание TUNEL выявило специфическое накопление поврежденных клеток в

структурах почек, включая эндотелиальные клетки клубочковой капиллярной сети и эпителиоциты канальцев нефрона, что было особенно заметно в проксимальных и дистальных, по сравнению с образцами контрольной группы (Рисунок 3.31).

В микропрепаратах почек животных II и III групп наблюдали значительное увеличение количества TUNEL-позитивных клеток, свидетельствующее о повышении фрагментации ДНК, после облучения в дозах 2 Гр и 8 Гр. Эти изменения были наиболее выражены в III группе (РОД 8 Гр), где доля TUNEL-позитивных клеток была наибольшей, что указывает на дозозависимое усиление клеточной гибели в структурах почки по мере увеличения дозы облучения ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 3.32, Рисунок 3.33).

В группах с предлучевым введением аскорбиновой кислоты наблюдали снижение числа TUNEL-позитивных клеток по сравнению с группами монооблучения (II-ая и III-я группы) (Рисунок 3.34).

В VI группе статистически значимых изменений в количестве TUNEL-позитивных клеток не наблюдали по сравнению с контрольной группой.

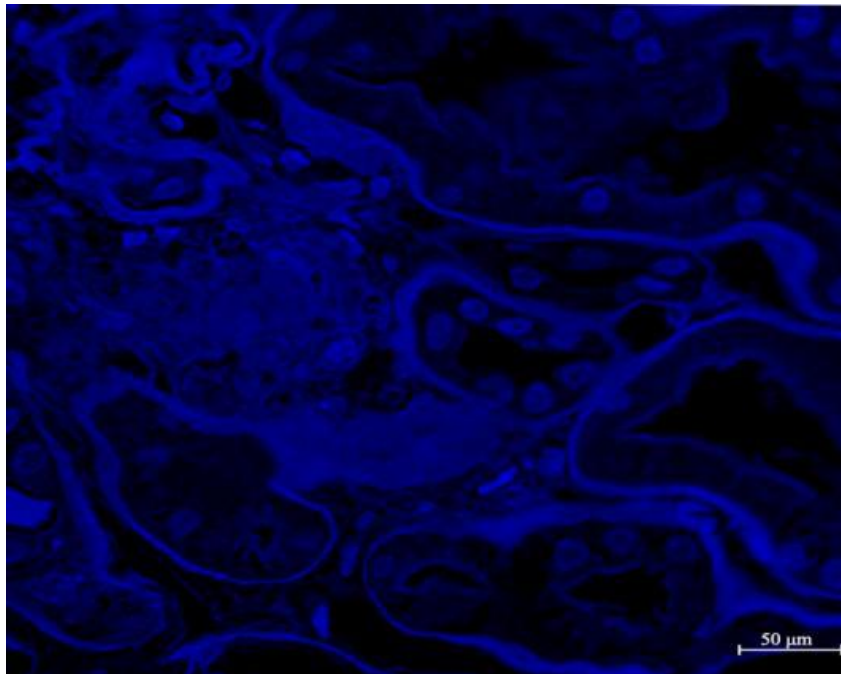


Рисунок 3.31 – Почки контрольной группы на 7-е сутки: TUNEL-позитивные клетки – отсутствуют (нет зеленого свечения ядер); DAPI – ядра (синее свечение); увелич.  $\times 100$

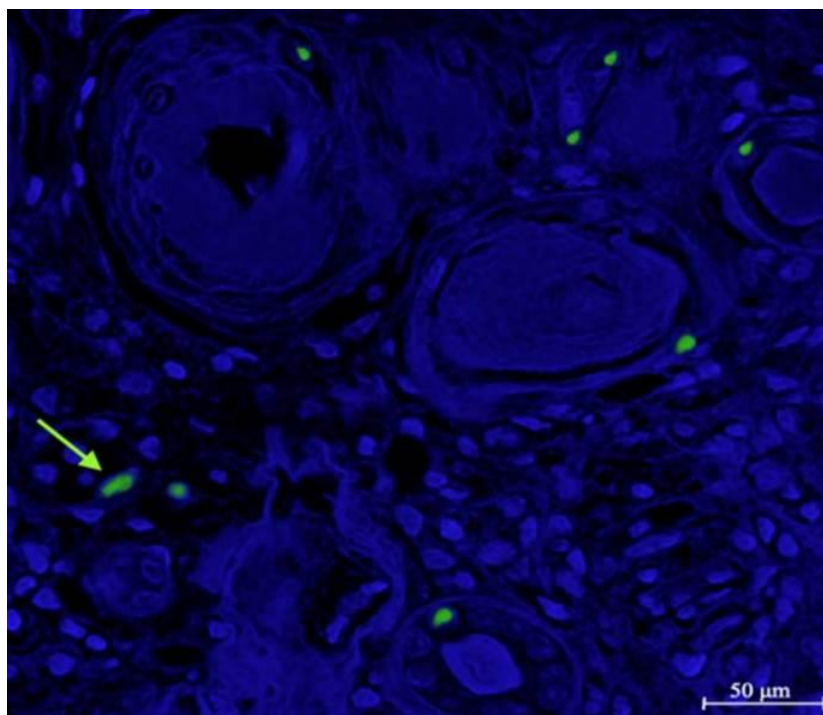


Рисунок 3.32 – Почки II на 7-е сутки после облучения электронами РОД 2 Гр: TUNEL-позитивные клетки (зеленое свечение ядер, стрелка); DAPI – ядра (синие свечение); увелич.  $\times 100$

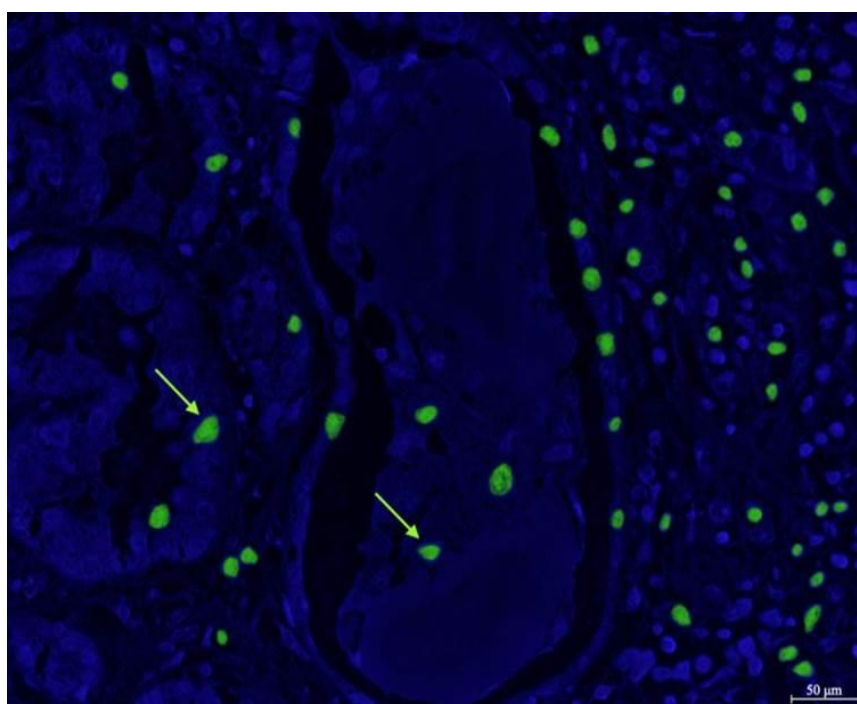


Рисунок 3.33 – Почки III на 7-е сутки после облучения электронами РОД 8 Гр: TUNEL-позитивные клетки (зеленое свечение ядер, стрелка); DAPI – ядра (синие свечение); увелич.  $\times 100$

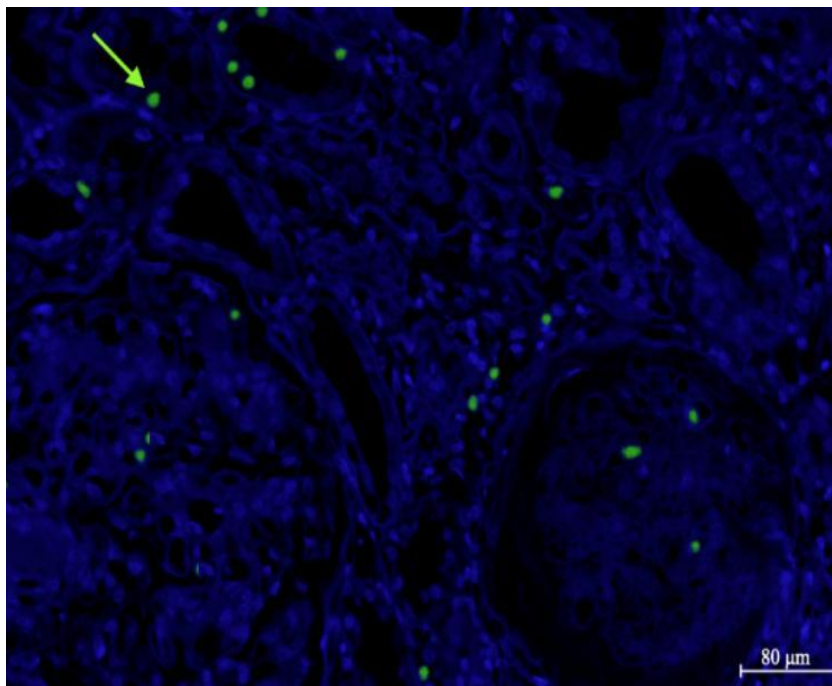


Рисунок 3.34 – Почки V на 7-е сутки после введения аскорбиновой кислоты и облучения электронами РОД 8 Гр: TUNEL-позитивные клетки (зеленое свечение ядер, стрелка); DAPI – ядра (синие свечение); увелич.  $\times 100$

### **3.6.3. Иммуногистохимическая оценка воспалительной реакции в почке после локального облучения электронами и при введении аскорбиновой кислоты**

При иммуногистохимическом исследовании распределения про- (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов в структурах почки выявили значительные изменения их экспрессии, зависящие от экспериментальной группы и типа цитокинов. Наиболее характерной особенностью микропрепаратов была слабая коричневая окраска цитоплазмы и коричнево-желтая окраска ядер (Рисунок 35, Рисунок 36, Рисунки 37 – 48).

При иммуногистохимической оценке микропрепаратов почек II-ой и III-ей групп наблюдали увеличение числа клеток, экспрессирующих IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ . Это увеличение было особенно выражено в эндотелии клубочковой капиллярной сети и незначительно в эпителии проксимальных и дистальных канальцев нефрона, а также в наружном листке капсулы клубочка. Количество клеток, окрашенных на провоспалительные цитокины в петле нефрона и собирательных протоках,

статистически значимо не изменилось ( $p > 0,05$ ) (Рисунок 35, Рисунок 36, Рисунки 37 – 42).

В IV-ой и V-ой группах было выявлено значительное снижение уровня экспрессии провоспалительных маркеров, таких как IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ , в эндотелиальных клетках клубочковой капиллярной сети и эпителии почечных канальцев. Количественные показатели воспалительной активности в этих группах были значительно ниже по сравнению со значениями II-ой и III-ей групп ( $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , соответственно), что подтверждает потенциальный защитный эффект аскорбиновой кислоты в предотвращении радиационно-индуцированного воспаления (Рисунок 35, Рисунок 36, Рисунки 37 – 42).

В VI-ой группе уровень экспрессии IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  не демонстрировал статистически значимых изменений по сравнению с контрольной группой (Рисунок 35, Рисунок 36, Рисунки 37 – 48).

При иммуногистохимическом исследовании противовоспалительных цитокинов микропрепаратов почек выявили следующие изменения: выраженная экспрессия IL-10 и IL-4 наблюдалась в эндотелии клубочковой капиллярной сети и в большинстве иммунных клетках интерстициальной ткани, преимущественно в корковом веществе почки. В то же время эпителий проксимальных и дистальных канальцев нефронов оставался иммунонегативным (Рисунок 35, Рисунок 36, Рисунки 43 – 48).

Количество позитивных иммунных клеток, экспрессирующих IL-10 и IL-4, увеличивалось в образцах почек групп с предлучевым введением аскорбиновой кислоты ( $p < 0,01$ ), что свидетельствует о снижении воспалительной реакции при использовании антиоксидантной защиты. В группах моно-облучения электронами также обнаружили увеличение доли IL-10- и IL-4-позитивных эндотелиоцитов клубочковой капиллярной сети по сравнению с контрольными значениями ( $p < 0,05$ ), при этом процентное содержание этих клеток было еще выше при предлучевом введении аскорбиновой кислоты (Рисунок 35, Рисунок 36, Рисунки 43 – 48).

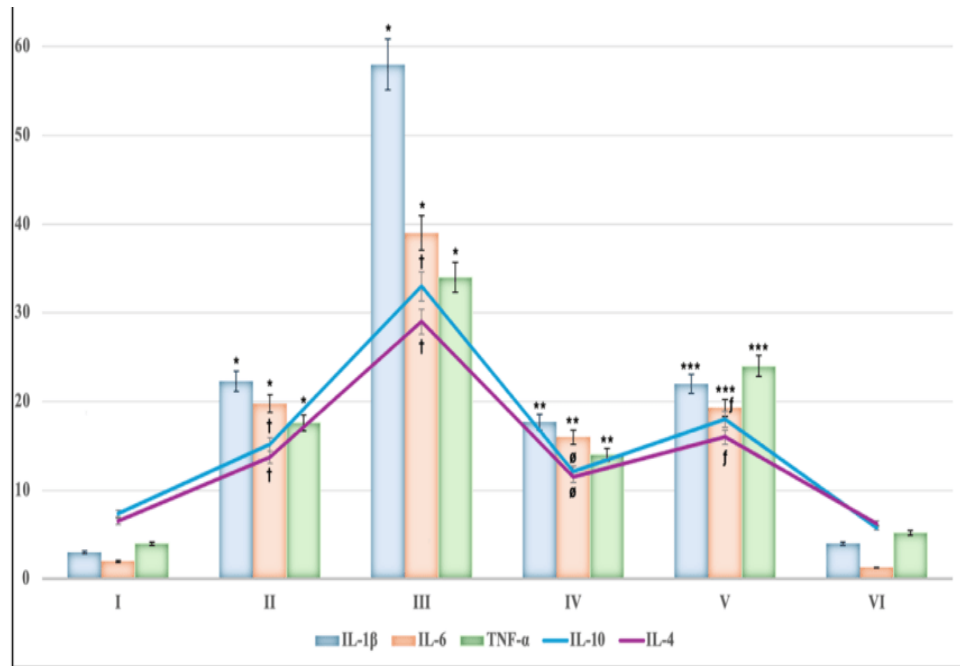


Рисунок 3.35 – Процентное содержание IL-1 $\beta$ -, IL-6-, TNF- $\alpha$ -, IL-10, IL-4-позитивных клеток в клубочках. Экспериментальные группы пронумерованы согласно дизайну эксперимента. Условные обозначения: достоверные различия по сравнению с контрольными значениями – \*; † ( $p < 0.05$ ); различия между II-ой и IV-ой – \*\* ( $p < 0.05$ ), ø ( $p < 0.05$ ); различия между III-ей и V-ой группами – \*\*\* ( $p < 0.01$ ),  $f$  ( $p < 0.01$ ).

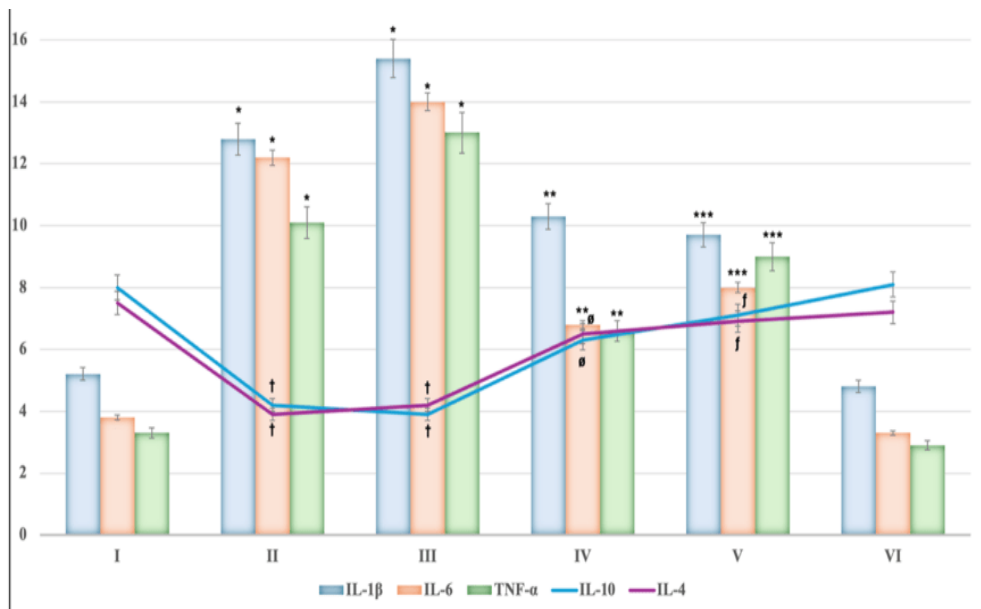


Рисунок 3.36 – Процентное содержание IL-1 $\beta$ -, IL-6-, TNF- $\alpha$ -, IL-10, IL-4-позитивных клеток в канальцах нефрона. Экспериментальные группы пронумерованы согласно дизайну эксперимента. Условные обозначения: достоверные различия по сравнению с контролем – \*; † ( $p < 0.05$ ); различия между II-ой и IV-ой – \*\* ( $p < 0.01$ ), ø ( $p < 0.01$ ); различия между III-ей и V-ой группами – \*\*\* ( $p < 0.01$ ),  $f$  ( $p < 0.01$ ).

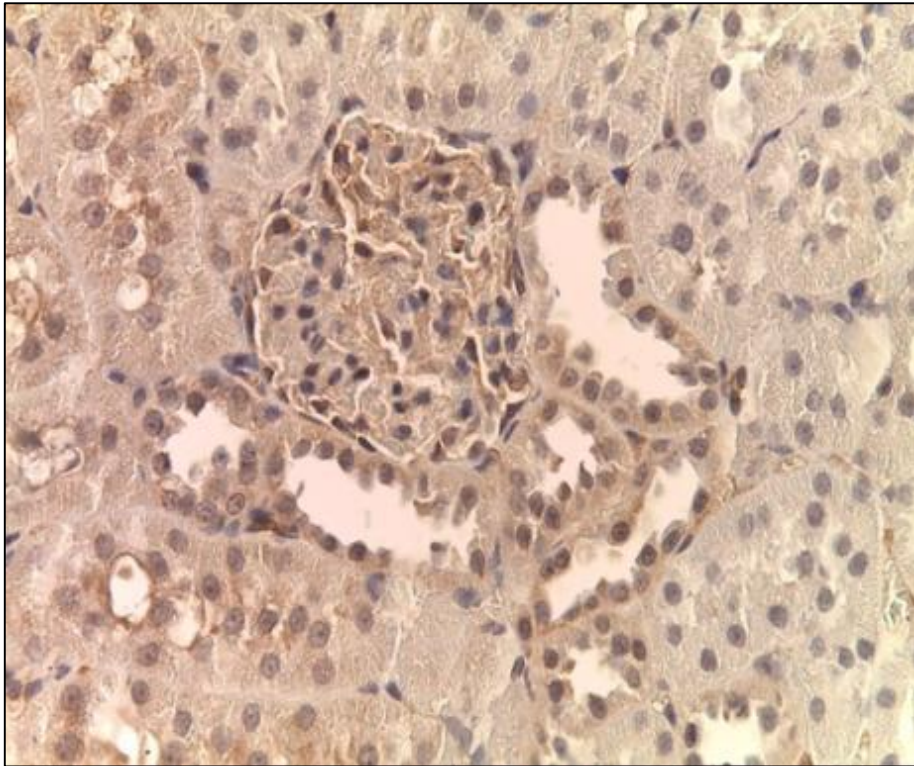


Рисунок 3.37 – Микропрепараты почки контрольной группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к IL-1 $\beta$ ; докрасивание ядер – гематоксилином. Увелич.  $\times 400$

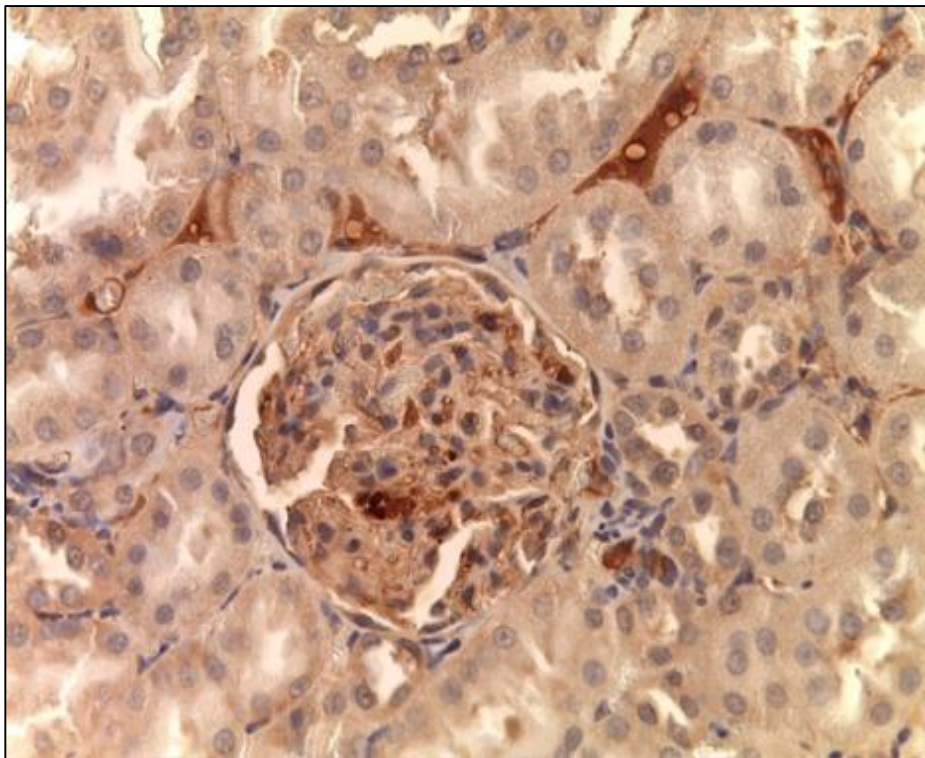


Рисунок 3.38 – Микропрепараты почки II-ой группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к IL-1 $\beta$ ; докрасивание ядер – гематоксилином. Увелич.  $\times 400$

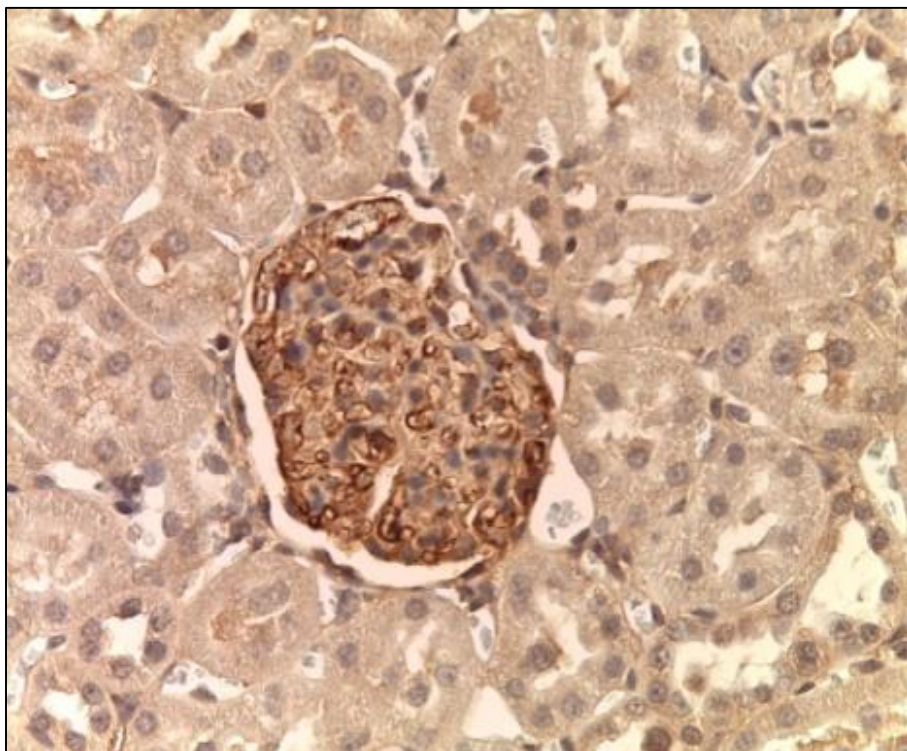


Рисунок 3.39 – Микропрепараты почки III-ей группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к IL-1 $\beta$ ; докрасивание ядер – гематоксилином. Увелич.  $\times 400$

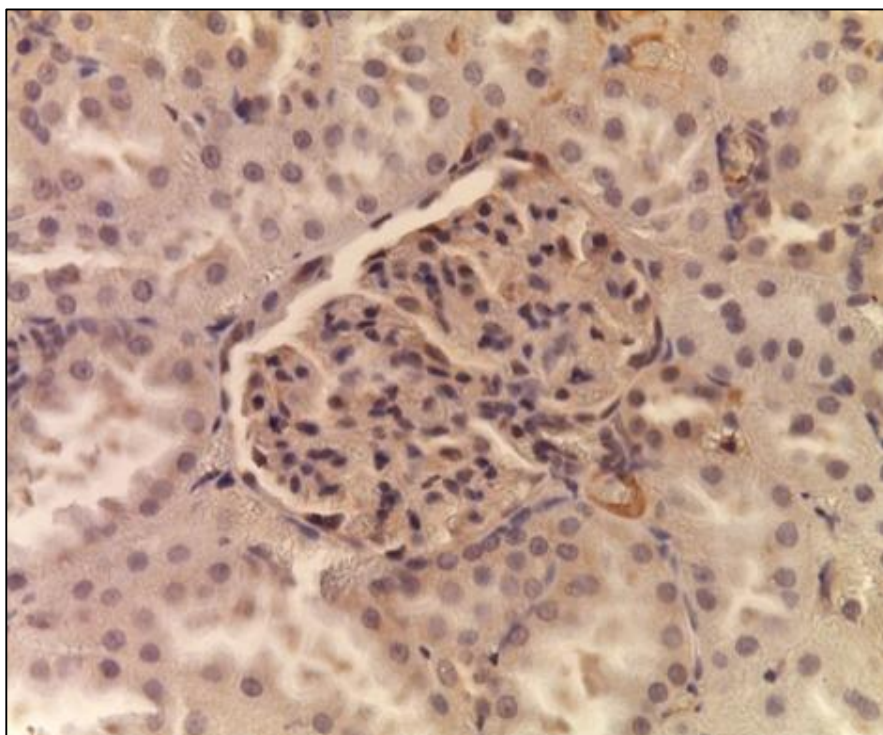


Рисунок 3.40 – Микропрепараты почки IV-ой группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к IL-1 $\beta$ ; докрасивание ядер – гематоксилином. Увелич.  $\times 400$

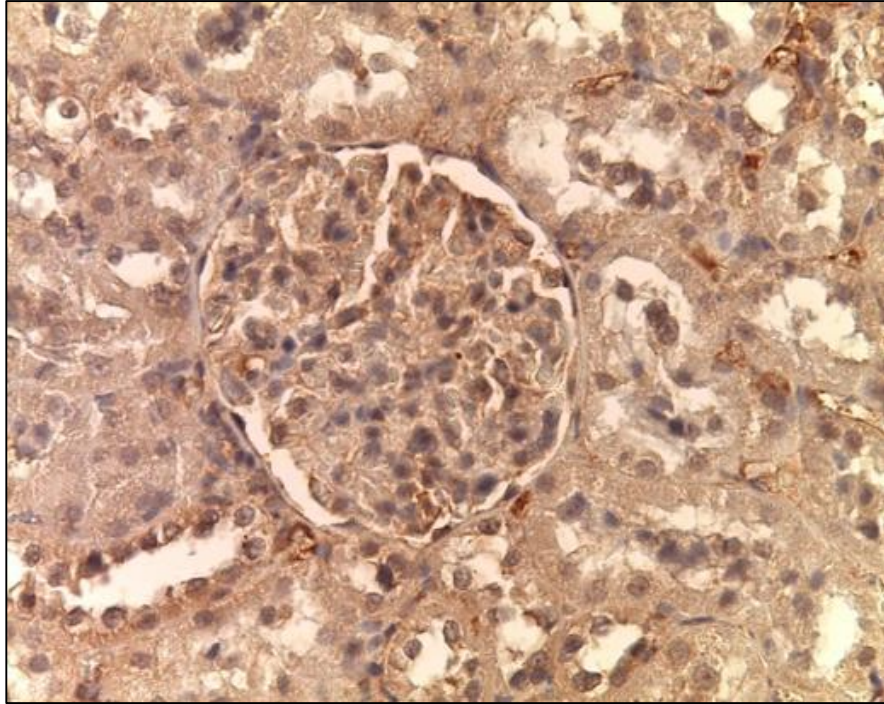


Рисунок 3.41 – Микропрепараты почки V-ой группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к IL-1 $\beta$ ; докрасивание ядер – гематоксилином. Увелич.  $\times 400$

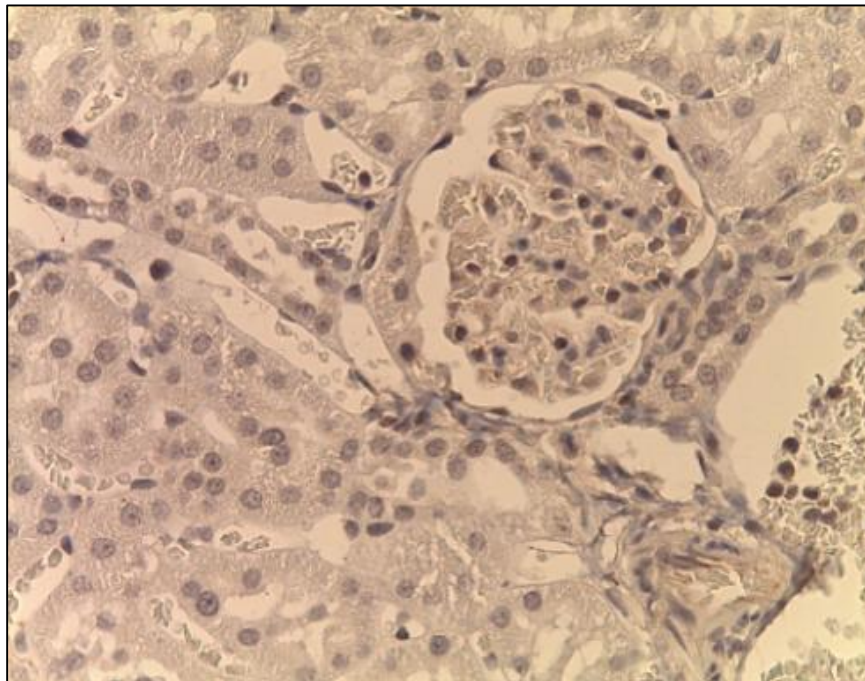


Рисунок 3.42 – Микропрепараты почки VI-ой группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к IL-1 $\beta$ ; докрасивание ядер – гематоксилином. Увелич.  $\times 400$

Между VI-ой и контрольной группами не было выявлено статистически значимых различий в распределении IL-4 и IL-10 позитивных клеток ( $p > 0,05$ ) (Рисунок 35, Рисунок 36, Рисунки 43 – 48).

Несмотря на повышение уровня противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10 в почке после облучения, этот эффект, вероятно, обусловлен реакцией на общий стресс и повреждение тканей, вызванные облучением, а не целенаправленной противовоспалительной реакцией. Увеличение доли IL-4- и IL-10-позитивных клеток, особенно в эндотелии клубочковой капиллярной сети и иммунных клетках интерстициальной ткани, свидетельствует о попытке организма смягчить воспалительный ответ и восстановить гомеостаз (Рисунок 35, Рисунок 36, Рисунки 43 – 48).

Предлучевое введение аскорбиновой кислоты привело к значительному снижению уровня провоспалительных цитокинов и повышению противовоспалительных цитокинов, что указывает на ее протективный эффект.

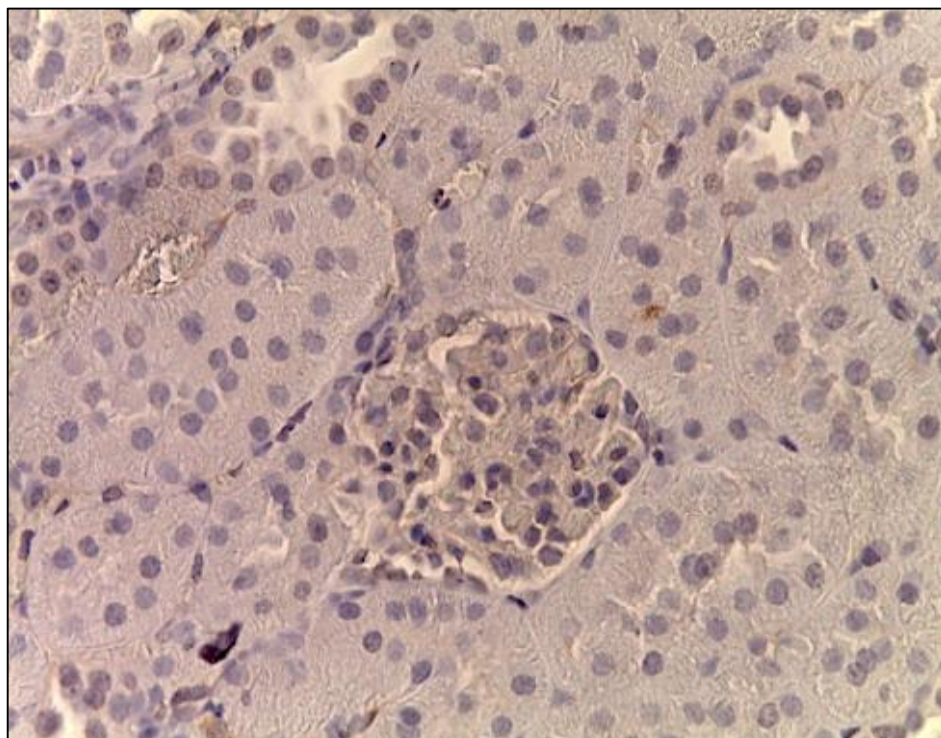


Рисунок 3.43 – Микропрепараты почки контрольной группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к IL-10; докрасивание ядер – гематоксилином. Увелич.  $\times 400$

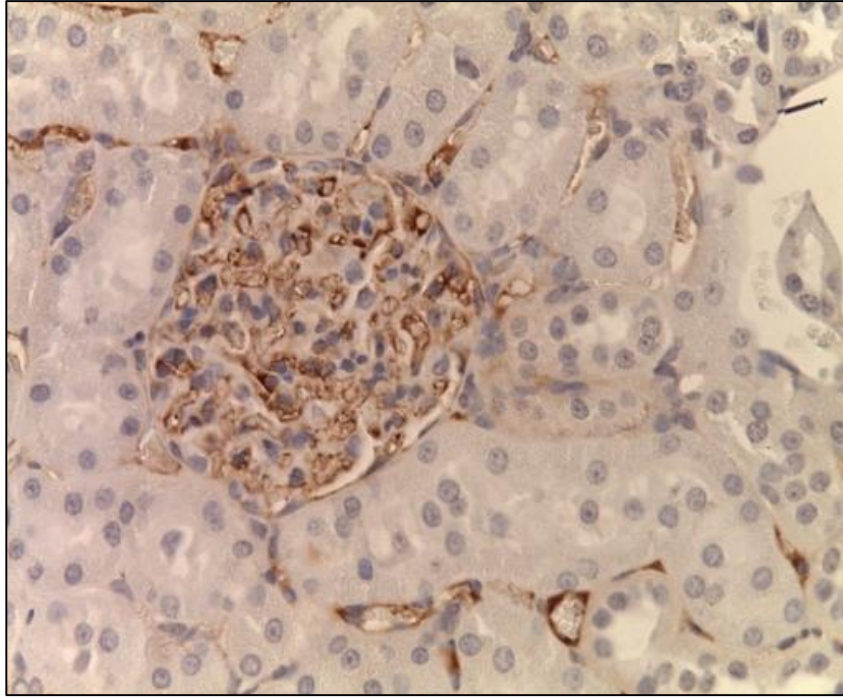


Рисунок 3.44 – Микропрепараты почки II-ой группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к IL-10; докрасивание ядер – гематоксилином. Увелич.  $\times 40$

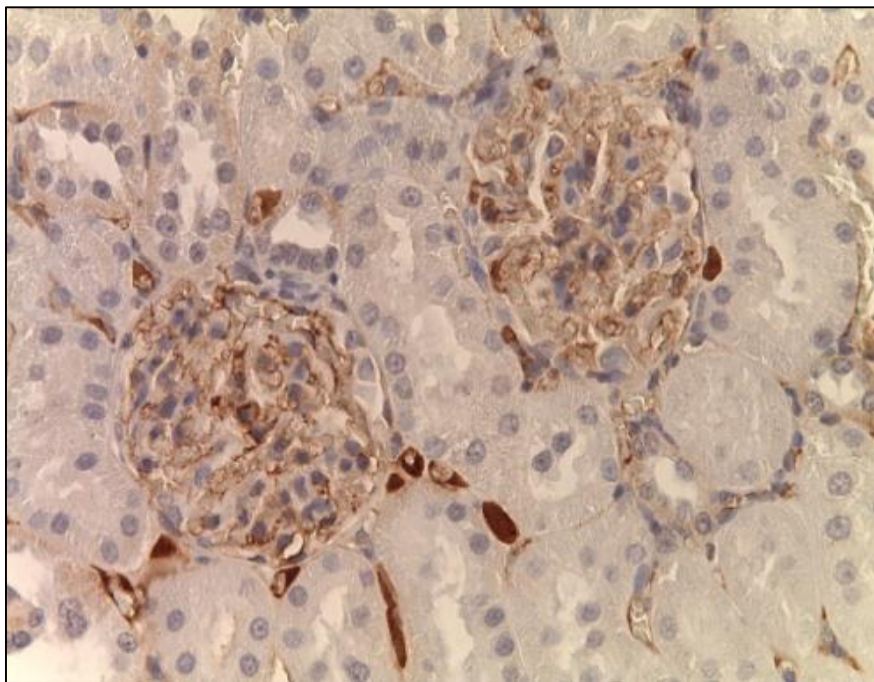


Рисунок 3.45 – Микропрепараты почки III-ей группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к IL-10; докрасивание ядер – гематоксилином. Увелич.  $\times 400$

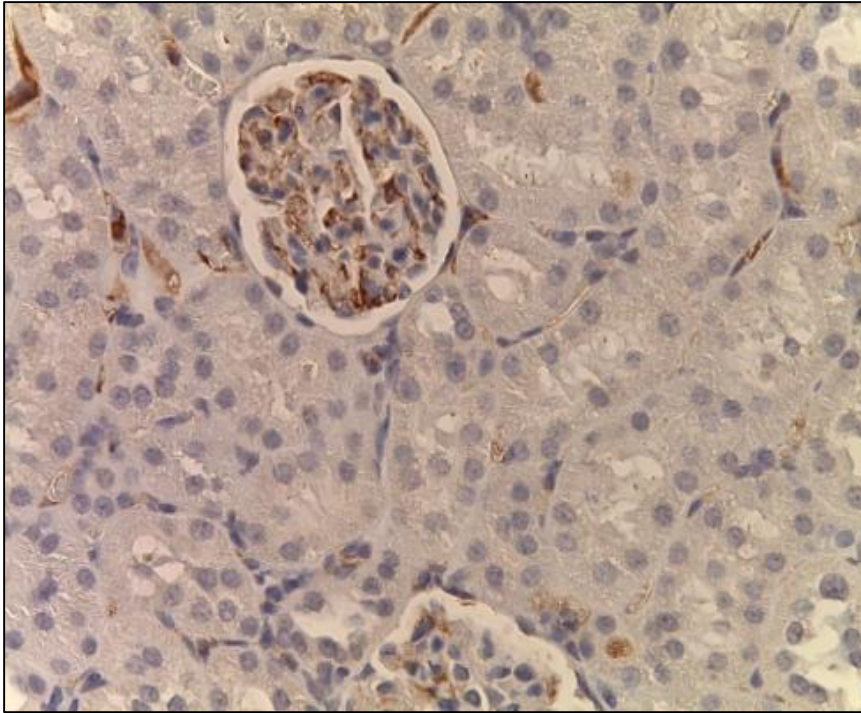


Рисунок 3.46 – Микропрепараты почки IV-ой группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к IL-10; докрасивание ядер – гематоксилином. Увелич.  $\times 400$

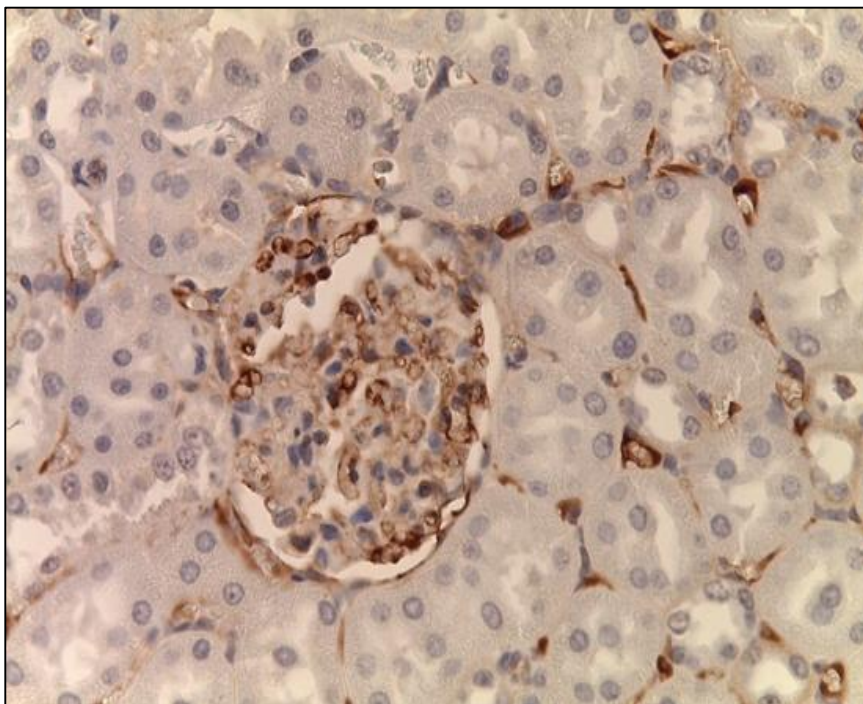


Рисунок 3.47 – Микропрепараты почки V-ой группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к IL-10; докрасивание ядер – гематоксилином. Увелич.  $\times 400$

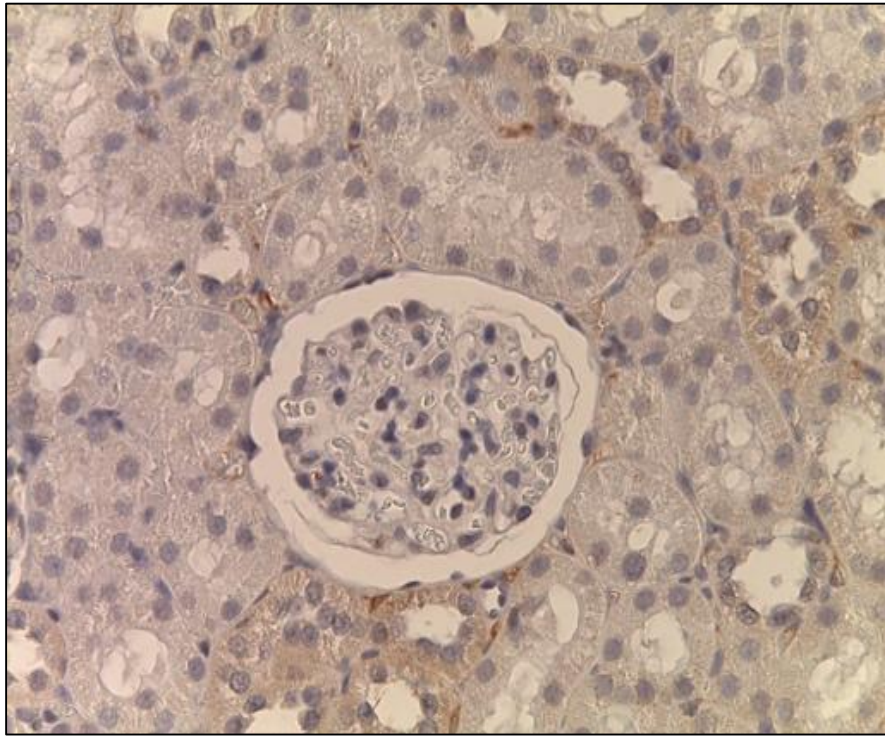


Рисунок 3.48 – Микропрепараты почки VI-ой группы на 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к IL-10; докрасивание ядер – гематоксилином. Увелич.  $\times 400$

Иммуногистохимически выявленные изменения со стороны элементов локальной про- воспалительной системы могут быть связаны с тем фактом, что антиоксидантная защита, обеспечиваемая аскорбиновой кислотой, ингибирует активацию маркеров оксидативного стресса и снижает интенсивность воспалительной реакции, что подтверждается уменьшением выраженности патоморфологических изменений в тканях почек.

Таким образом, облучение почек электронами в любой дозе приводит к активации как про- (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), так и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов, что указывает на комплексный характер воспалительной реакции в ответ на радиационное повреждение тканей. В группах, подвергшихся облучению в дозах РОД 2 Гр и РОД 8 Гр, выявили значительное увеличение экспрессии провоспалительных цитокинов, особенно в эндотелии клубочковой капиллярной сети, что указывает на развитие воспалительного процесса, сопровождающегося клеточным стрессом и повреждением.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данное диссертационное исследование посвящено решению актуальной научной задачи – выявлены морфофункциональные изменения клубочков почки и нефроцитов канальцев нефронов при радиационной нефропатии, индуцированной воздействием электронами, определены дозозависимые эффекты, раскрыты интратрениальные регуляторные механизмы локального гомеостаза, а также при предлучевом введении аскорбиновой кислоты. Для реализации поставленной цели проведено комплексное морфологическое и иммуногистохимическое исследования структур почки после однократного локального облучения электронами в разовой очаговой дозе (2 Гр, 8 Гр).

### 4.1. Воздействие локального облучения электронами на почки

По результатам исследования настоящей работы было выявлено, что локальное облучение электронами почечной ткани в разовой облучающей дозе 2 Гр и 8 Гр приводит к лучевым повреждениям различной степени выраженности: снижение количества клубочков, расширение капсулы клубочка, дистрофические изменения эпителия проксимальных и дистальных канальцев нефрона, а также признаки сопутствующей воспалительной реакции и отека интерстициальной ткани. Наиболее ярко данные патоморфологические изменения регистрировались в III-ей группе, где доза облучения электронами равнялась 8 Гр. Потенциальные пути образования радиационно-индуцированной нефропатии после воздействия электронами в РОД 2 Гр и РОД 8 Гр представлены на рисунке 4.1.

В свою очередь, похожие паттерны патоморфологических повреждений наблюдались и в других исследованиях, где радиационное воздействие приводило к развитию гломерулосклероза, тубулоинтерстициального фиброза и некротических изменений канальцев при дозах свыше 8 Гр, однако авторы исследовали иные виды облучения: рентген- и гамма-лучи (Robbins et al., 2001; Stephens et al., 1995). Эти результаты указывают на высокую

радиочувствительность структур почки к ионизирующему излучению, что связано с ее интенсивной васкуляризацией и высокой метаболической активностью эпителиальных клеток канальцев нефронов.

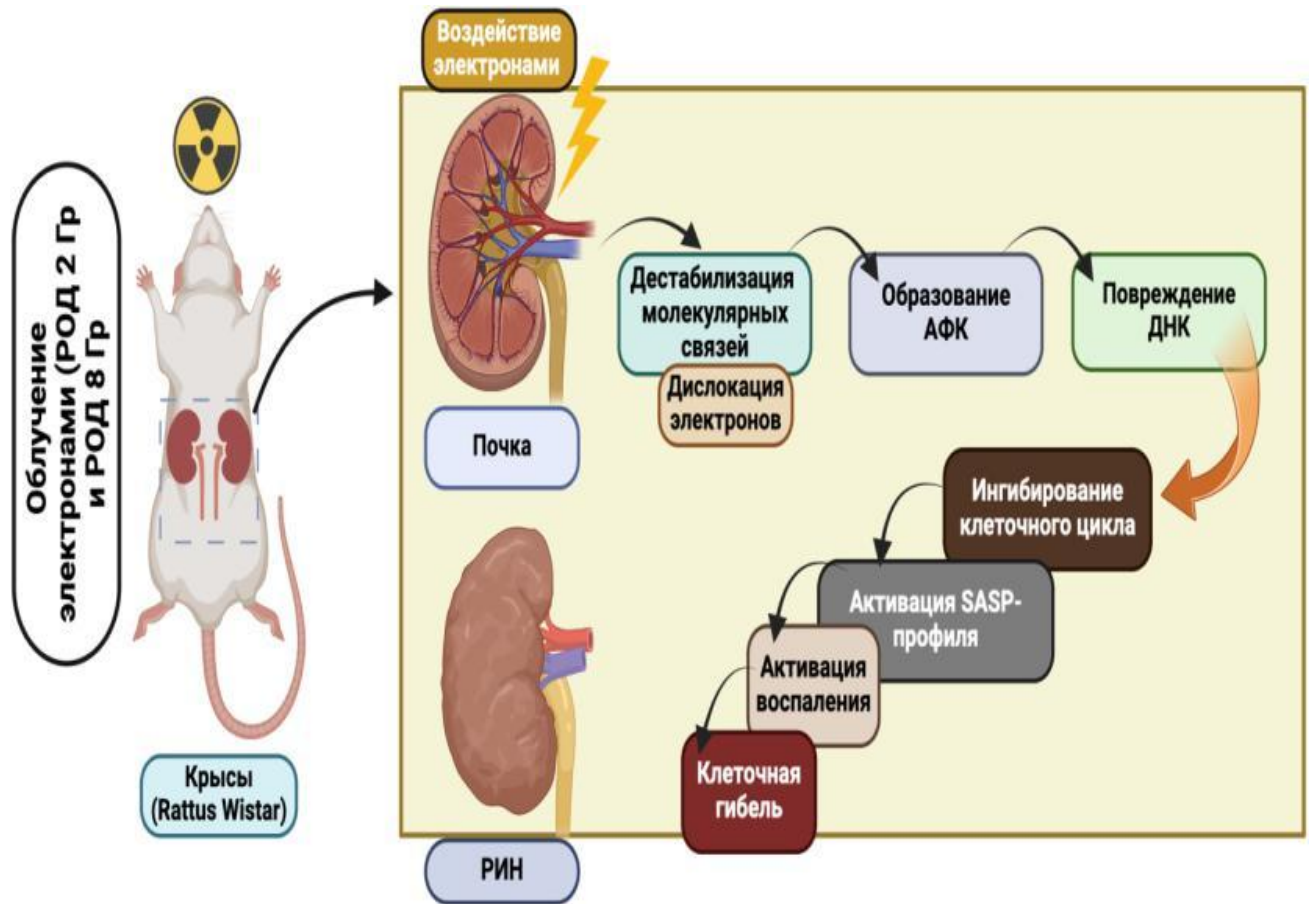


Рисунок 4.1 – Иллюстрация механизма радиационно-индуцированной нефропатии после облучения электронами. РОД – разовая очаговая доза, АФК – активные формы кислорода, ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, SASP (англ. Senescence-Associated Secretory Phenotype) – ассоциированный со старением секреторный фенотип, РИН – радиационно-индуцированная нефропатия

Важно отметить, что в нашем исследовании повреждения почек после облучения электронами в дозах РОД 2 Гр и РОД 8 Гр были менее выражены по сравнению с данными других исследований, в которых использовались рентгеновские лучи или гамма-излучение при аналогичных дозах. Например, при рентгеновском облучении в дозе 6 Гр наблюдались значительные деструктивные изменения эпителия канальцев нефрона и клубочков, сопровождающиеся воспалением и некрозом, что указывает на более выраженное повреждение структур почки по сравнению с облучением электронами (Mercantepe et al., 2019).

Вероятно, это связано с более «мягким» и локализованным распределением энергии при облучении электронами, что ограничивает повреждающее действие на окружающие ткани и минимизирует вероятность развития радиационно-индуцированного нефрита. Этот вывод подтверждается нашими данными других исследований, показывающих, что использование электронного облучения, например, в радиотерапии злокачественных новообразований кожи и яичек (семенников) может быть менее повреждающим по сравнению с другими типами облучения (Вадюхин и соавт., 2022; Demyashkin et al., 2022).

Высокие дозы ионизирующего излучения (ИИ) способны активировать механизмы ингибирования клеточного цикла, приводящая к повреждениям ДНК и развитие оксидативного стресса (Dos Santos et al., 2023). В то же время, при анализе тканей почек и головного мозга, подвергшихся воздействию ИИ, выявили разную степень экспрессии генов, что опровергает предположение о единообразии генетических изменений в клетках (Zhao et al., 2006). Скорее всего изначально происходит индукция разных белков-регуляторов мембранных структур с последующей активацией разнородных сигнальных путей. Более того, было обнаружено, что инфракрасное излучение в фракционном режиме в высоких дозах способно вызывать аутоиммунные заболевания у мышей, что указывает на вовлечения компонентов иммунной системы, в частности Т-клеток, в развитии радиационно-индуцированной токсичности (Sakaguchi et al., 1992).

Ключевым механизмом радиационно-индуцированных повреждений почек является оксидативный стресс, вызванный накоплением активных форм кислорода и перекисным окислением липидов клеточных мембран. Наши результаты подтверждают это, показывая значительное повышение уровня малонового диальдегида (MDA), маркера липидного перекисного окисления, и снижение активности супероксиддисмутазы (SOD) и глутатиона (GSH), важных компонентов антиоксидантной защиты организма, после облучения электронами. Данные изменения свидетельствуют об активации оксидативного стресса и сопутствующего нарушения естественной антиоксидантной защиты клеток. Настоящие данные согласуются с результатами других авторов, где при

воздействии  $\gamma$ -излучения на почечную ткань были зафиксированы изменения маркеров эндогенной антиоксидантной защиты (Fouad et al., 2019). Похожие данные были получены в исследованиях других авторов, использовавших дозу гамма-облучения 8 Гр для облучения яичек у крыс, что также приводило к развитию выраженных структурных изменений и изменений антиоксидантных маркеров (Shaban et al., 2017). Воздействие электронов на почечную ткань приводит к выбросу большого количества РФК – индукторов оксидативного стресса, активаторов апоптоза и фрагментации ДНК (Yumusak et al., 2018). Подтверждением активации апоптоза в тканях почки является обнаруженное увеличение уровней каспаза-3 и p-53.

Известно, что оксидативный стресс не только вызывает повреждение клеточных мембран, органелл и ДНК, но и активирует каскад сигнальных путей, ведущих к апоптозу. В настоящей работе мы исследовали иммуногистохимический профиль почечной ткани с антителами к Ki-67 и каспазе-3.

Согласно результатам нашего исследования, облучение почечной ткани электронами в дозах 2 Гр и 8 Гр приводило к увеличению уровня каспазы-3, ключевого фермента, участвующего в завершающих этапах апоптоза. При этом происходило уменьшение пролиферативного индекса. Обнаруженное подтверждает дисбаланс пролиферации и апоптоза, который идёт скорее всего по внутреннему пути и переориентацией маркеров сигнальных путей GSK3-, ERK- и Ras/Raf/MEK-1 (Li et al., 2022; Tian et al., 2020; Degirmenci et al., 2020; Wang et al., 2006).

Дополнительно, при анализе сыворотки крови в группах, подвергшихся облучению, было также выявлено значительное повышение уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ 1, ИЛ6 и др.), что указывает на активный воспалительный процесс. Повышение уровней провоспалительных цитокинов свидетельствует о развитии острого воспаления в ответ на радиационное повреждение электронами. Основные механизмы лучевого повреждения почек представлены на рисунке 4.2

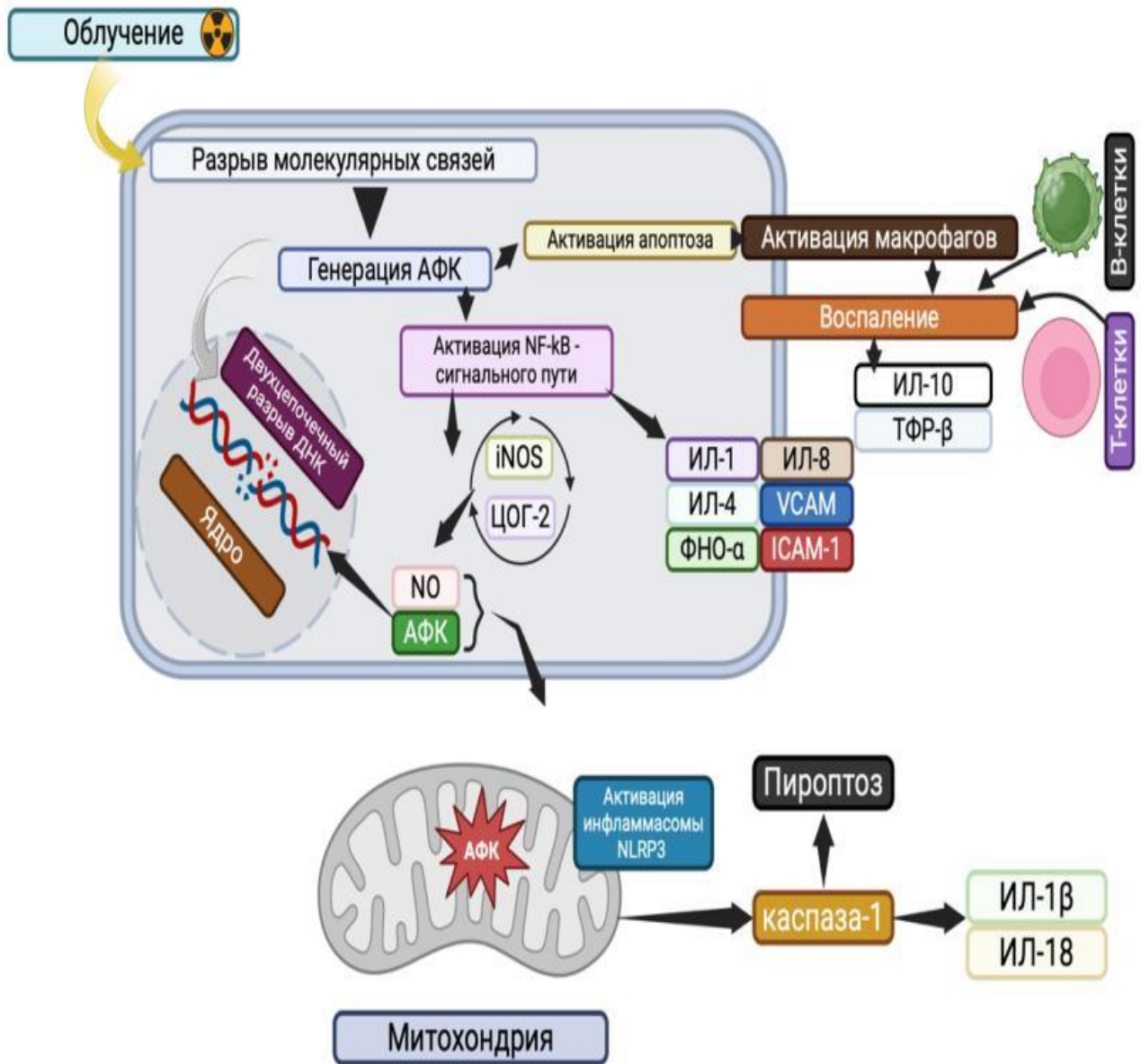


Рисунок 4.2 – Механизмы лучевых повреждений почки. АФК – активные формы кислорода, ТФР- $\beta$  – трансформирующий фактор роста- $\beta$ , NF-kB – транскрипционный ядерный фактор-kB, ФНО- $\alpha$  – фактор некроза опухоли- $\alpha$ , ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии-1, VCAM – васкулярная молекула клеточной адгезии, ИЛ – интерлейкины, iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота, NLRP3 – цитозольный белок NLRP3 (активация инфламмосомы на поверхности митохондрии), ЦОГ-2 – циклооксигеназа-2, NO – оксид азота

Подобные результаты получены и в других исследованиях, где облучение приводило к активации провоспалительных цитокинов в почках и других органах, что способствовало усилению воспалительного ответа и увеличению повреждения тканей (Klaus et al., 2021; François et al., 2013; Паршенков М. и др., 2024). В то же время, отмечено повышение уровня противовоспалительных цитокинов в

структурах почки, таких как IL-10, что, вероятно, связано с попыткой организма компенсировать развивающееся воспаление. Однако, как показывают наши данные, этот компенсаторный механизм оказывается недостаточным при высоких дозах облучения, что приводит к преобладанию воспалительной реакции и усилению повреждений тканей (Linard et al., 2004).

Воздействие электронов в разовых дозах облучения (РОД) 2 Гр и 8 Гр на почки привело к увеличению концентрации провоспалительных цитокинов в кровотоке, а также повышению их уровня в структурах почки, что было подтверждено иммуногистохимическими исследованиями. В специализированной литературе имеются данные, подтверждающие активацию других сигнальных молекул, особенно IFN, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-18, в первые сутки после облучения, хотя в этих исследованиях использовали другие типы излучения, а не  $\beta$ -излучение (Bahrauni Toosi et al., 2023). Подавление факторов воспаления и запуск сигнальных путей может снизить степень повреждения здоровых тканей, что является одним из эффективных условий для уменьшения негативного радиационного воздействия (Zhang et al., 2023).

#### **4.2. Радиопротективное действие аскорбиновой кислоты**

Наше исследование было направлено на изучение радиопротекторных свойств аскорбиновой кислоты (АК) в модели острой лучевой нефропатии, индуцированной облучением почек в разовых очаговых дозах 2 Гр и 8 Гр. В рамках данного исследования были выявлены значительные морфологические изменения в структурах почки, такие как отек, расширение капсулы клубочка, дистрофические изменения эндотелия клубочковой капиллярной сети и выраженные дистрофические изменения эпителия проксимальных и дистальных канальцев нефрона. В то же время, предлучевое введение аскорбиновой кислоты за 60 минут до начала облучения показало способность значительного снижения этих повреждений, что подчеркивает ее радиопротекторные свойства и потенциальную эффективность в предотвращении радиационно-индуцированных изменений в почках (Рисунок 4.3).

Механизмы радиопротекторного действия аскорбиновой кислоты представляют особый интерес благодаря её способности уменьшать повреждения, вызванные облучением различных органов, что подтверждено в ряде исследований (Fischer et al., 2018). Так, эксперименты *in vivo* на модели фибросаркомы у мышей показали, что введение АК в дозе 4,5 мг/г массы тела усиливает эффективность радиотерапии за счёт снижения TCD50, показателя роста опухоли (Okunieff et al., 1987). Кроме того, АК продемонстрировала защитные свойства в отношении окружающих здоровых тканей, увеличивая показатели RD50 при острых кожных реакциях и LD50 при поражении костного мозга (Okunieff et al., 1987). Наибольшая эффективность радиопротективных свойств АК отмечается при низких дозах облучения (González et al., 2018).

Биохимический анализ показал, что введение АК приводило к снижению уровня малонового диальдегида (MDA) и стабилизации активности супероксиддисмутазы (SOD) и уровня глутатиона (GSH) в почках по сравнению с группами, подвергшимися только монооблучению. Эти результаты можно объяснить способностью АК эффективно связывать свободные радикалы и ингибировать процессы перекисного окисления липидов.

Высокая молекулярная масса и гидрофильные свойства АК позволяют ей проникать в клетки и взаимодействовать с реактивными формами кислорода (РФК), предотвращая их повреждающее действие. Это согласуется с выводами других исследований, которые указывают на способность АК снижать оксидативный стресс и повышать антиоксидантный потенциал клеток через активацию эндогенных антиоксидантных систем, таких как глутатионпероксидаза и каталаза (Intarasit et al., 2021; Shanker et al., 2004). В других исследованиях также было показано, что АК модулирует систему антиоксидантной защиты в коже мышей при фракционированном гамма-облучении, значительно увеличивая активность SOD, глутатионпероксидазы и содержание глутатиона, а также подавляя перекисное окисление липидов (Jagetia et al., 2003).

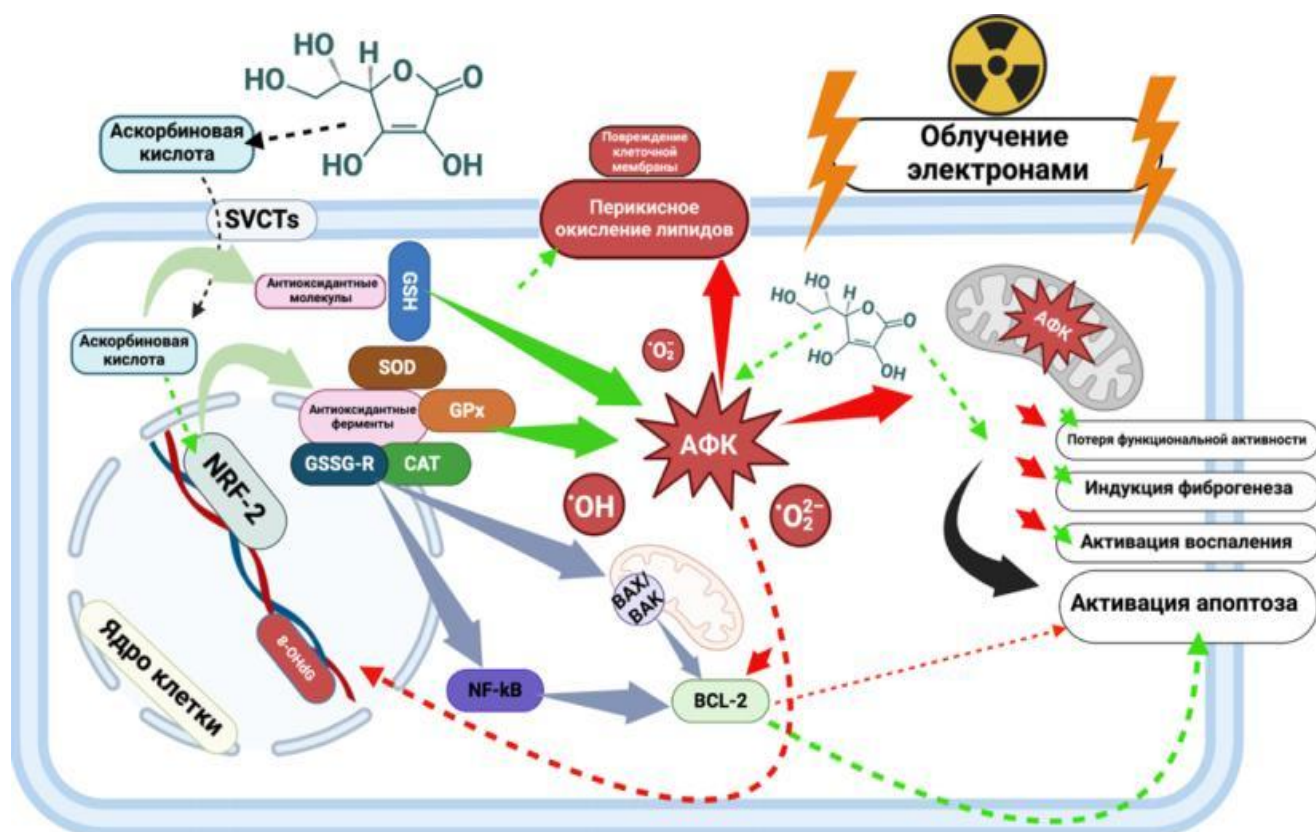


Рисунок 4.3 – Схема защитного действия аскорбиновой кислоты при радиационно-индуцированных повреждениях почки: механизмы антиоксидантной и противовоспалительной активности. Красные стрелки – указывают на процессы клеточного повреждения, активации сигнальных путей апоптоза и индукции воспаления. Зеленые стрелки – обозначают защитные механизмы аскорбиновой кислоты. АФК – активные формы кислорода, SVCTs (англ. Sodium-dependent Vitamin C Transporters) – натрий-зависимые транспортёры витамина С (аскорбиновая кислота), SOD (англ. Superoxide Dismutase) – супероксиддисмутаза, GPx (англ. Glutathione Peroxidase) – глутатионпероксидаза, GSSG-R (англ. Glutathione Reductase) – глутатионредуктаза, CAT (англ. Catalase) – каталаза, NRF-2 (англ. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2) – ядерный фактор, ассоциированный с эритроидным фактором 2 (NRF-2), NF-κB – транскрипционный ядерный фактор-κB, BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2) – белок В-клеточной лимфомы 2, BAX/BAK (Bcl-2-Associated X Protein / Bcl-2 Antagonist Killer) – белки, регулирующие апоптоз (BAX/BAK)

АК также проявляет противоопухолевые свойства через ингибирование неоваскулогенеза, необходимого для роста опухоли (Mikirova et al., 2008). В ряде других исследований было показано, что АК ингибирует маркеры оксидативного стресса, инактивирует экспрессию клеточных сигнальных путей, моделируя апоптотический каскад, и способствует восстановлению поврежденной ДНК, тем

самым снижая радиационно-индуцированные повреждения (Morel et al., 2009; Allum et al., 2020).

В нашем исследовании предлучевое введение АК также приводило к значительному снижению уровня апоптоза в почечной ткани, что подтверждается снижением уровня экспрессии маркеров апоптоза, таких как каспаза-3 и p53, по сравнению с группами монооблучения. Это антиапоптотическое действие АК можно объяснить её способностью модулировать активность проапоптотических и антиапоптотических белков, таких как Bax и Bcl-2, что также подтверждено рядом других исследований (Демяшкин в соавт., 2024; Gavathiotis et al., 2012; Jafari Anarkooli et al., 2009; Wenzel et al., 2004). В нашем исследовании наблюдалось снижение уровня каспазы-3 и p53 в группах с предлучевым введением АК, что указывает на снижение апоптотической активности и активацию репаративных процессов в структурах почки. Прежде всего в клубочках. В других исследованиях также было продемонстрировано, что АК подавляет радиационно-индуцированное старение фибропластических клеток млекопитающих, нивелируя отсроченный окислительный стресс и ингибируя накопление p53 (González et al., 2018). Кроме того, было показано, что АК обладает репаративным потенциалом при воздействии на генетический материал различных типов облучения (Fujii et al., 2010).

В группе животных, которым вводили АК до облучения концентрация ключевых провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) была понижена, а уровень противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10) – повышен. Это связано с тем, что АК благодаря антиоксидантным свойствам (наличие ОН- групп) способна модулировать иммунный ответ, «заменяя» одни маркеры воспаления на другие. Аналогично, по-видимому, происходит и с маркерами сигнальных путей (Yamamoto et al., 2001; Harakeh et al., 1997).

Такие же эффекты отмечали некоторые авторы при введении других препаратов также обладающих антиоксидантными свойствами (N-ацетилцистеин, витамины и др.) (El-Sonbaty et al., 2021).

### 4.3. Итоги выполнения диссертационной работы

В настоящее время воздействие электронов на структуры почки, а именно параметры дозирования, характер и глубина повреждений при разовом и фракционном облучении, а также введение радиопротекторов, остается недостаточно изученным. Разработка и усовершенствование экспериментальных моделей радиационно-индуцированной нефропатии является актуальным.

Проведенная комплексная работа продемонстрировала дозозависимый характер морфологических изменений структур почек при однократном локальном облучении электронами. Однократное облучение в разовых очаговых дозах 2 Гр и 8 Гр приводит к морфологическим и молекулярно-биологическим изменениям структур почки: уменьшение количества клубочков, дистрофические изменения и частичная атрофия эпителия проксимальных и дистальных канальцев нефрона; уменьшение количества Ki-67-позитивных эндотелиоцитов клубочковой капиллярной сети и эпителиоцитов проксимального и дистального почечных канальцев на фоне увеличения в этих клетках каспаза-3; клеточная воспалительная инфильтрация, разрастание волокнистого компонента, обилие кровеносных сосудов. Обнаруженные изменения были более выражены при РОД 8 Гр. При TUNEL исследовании выявлено увеличение количества разрывов ДНК, возникших вследствие клеточной гибели эндотелия клубочков и эпителиоцитов проксимальных и дистальных канальцев нефрона после локального однократного облучения электронами, особенно в РОД 8 Гр. Показано, что локальное облучение электронами в дозе 2 Гр и дозе 8 Гр структур почки приводит к увеличению концентрации креатинина, азота мочевины, С-реактивного белка и цистатин-С-креатининового соотношения, особенно в РОД 8 Гр. При иммуноферментном анализе гомогената почки после однократного локального облучения электронами в дозах 2 Гр и 8 Гр обнаружено повышение концентрации малонового диальдегида и понижение уровня супероксиддисмутазы и глутатиона.

Предлучевое введение аскорбиновой кислоты (до локального воздействия электронами) проявляет ее радиопротекторные свойства, выраженные в снижении

уровня оксидативного стресса, воспалительных реакций и апоптоза в структурах почек.

Таким образом, предлучевое введение аскорбиновой кислоты показывает протективное действие, снижая степень выраженности поражения сосудистых клубочков и нефроцитов.

#### **4.4. Перспективы развития темы диссертационной работы**

В дальнейшем следует продолжить разработку этой темы, прежде всего – акцентируя внимание на электронотерапию в режиме фракционирования. При этом важно проанализировать поздние / хронические постлучевые осложнения структур почек – сосудистого клубочка и эпителия канальцев нефрона. Целесообразно использования для этого современные молекулярно-биологические (пространственный анализ) и молекулярно-генетические (в том числе протеомика) методы.

С другой стороны, важно продолжить научные работы по поиску более эффективные радиопротекторные соединения.

## ВЫВОДЫ

1. Воздействие электронами в РОД 8 Гр, в отличие от РОД 2 Гр, характеризуется выраженными морфологическим изменениям: атрофия (3/2 – 3), вакуолизация (3/2 – 3) или дистрофия эпителия канальцев нефрона (3/2 – 3); некробиотические изменения (2/2 – 3); воспаление (1,5/1 – 2). Площадь поражения почки при этом достигает 1/5. Аскорбиновая кислота способствует снижению степени выраженности радиационно-индуцированной нефропатии, в том числе после воздействия электронами в РОД 8 Гр: атрофия (2/2 – 2), вакуолизация (2/1 – 1.5), дистрофия эпителия канальцев нефрона (2/1 – 1.5); некробиотические изменения (2/1 – 1); воспаление (1/0 – 1).

2. Однократное локальное облучение почки электронами в дозе 2 Гр и 8 Гр привело к статистически значимым изменениям уровней концентрации некоторых биохимических маркеров сыворотки крови: увеличение креатинина (2 Гр –  $0,563 \pm 0,015$  мг/дл; 8 Гр –  $0,641 \pm 0,024$  мг/дл), азота мочевины (2 Гр –  $18,56 \pm 0,38$  мг/дл; 8 Гр –  $22,1 \pm 0,13$  мг/дл), С-реактивного белка (2 Гр –  $2,81 \pm 0,029$  мг/л; 8 Гр –  $3,54 \pm 0,21$  мг/л) и цистатин-С-креатининового соотношения (2 Гр –  $6,15 \pm 0,07$  нг/мл/мг/дл; 8 Гр –  $7,18 \pm 0,1$  нг/мл/мг/дл). Предлучевое введение аскорбиновой кислоты статистически снижало уровень концентрации данных маркеров (относительно групп облучения), обеспечивая частичную защиту структур почки от радиационного повреждения.

3. Однократное локальное облучение почки электронами в дозе 2 Гр и дозе 8 Гр приводит к окислительному стрессу, характеризующегося повышением уровня малонового диальдегида (MDA; 2 Гр –  $34,6 \pm 2,7$  нмоль/мг белка, 8 Гр –  $79,5 \pm 4,2$  нмоль/мг белка), снижением активности супероксиддисмутазы (SOD; 2 Гр –  $53,4 \pm 3,1$  Ед/мг белка, 8 Гр –  $42,1 \pm 2,2$  Ед/мг белка) и уровня глутатиона (GSH; 2 Гр –  $9,4 \pm 0,5$  мкмоль/мг белка, 8 Гр –  $8,1 \pm 0,3$  мкмоль/мг белка), повышением маркеров апоптоза – каспазы-3 (2 Гр –  $6,2 \pm 0,6$  нг/мг, 8 Гр –  $9,3 \pm 0,9$  нг/мг) и p53 (2 Гр –  $28,5 \pm 0,7$  нг/г, 8 Гр –  $37,6 \pm 2,2$  нг/г). Аскорбиновая кислота способна

усиливать систему естественной эндогенной антиоксидативной защиты, приводя к сбалансированию значений изучаемых маркеров.

4. Однократное локальное облучение почки электронами в РОД 8 Гр приводит к снижению количества Ki-67-позитивных клеток – на 23,3 % (в клубочках), 45,3 % (в проксимальных и дистальных канальцах нефронов), 18,1 % (в петле нефрона и собирательных протоках) и увеличению количества каспаза-3-позитивных клеток – на 41,2 % (в клубочках), 59,8 % (в проксимальных и дистальных канальцах нефронов), 17,2 % (в петле нефрона и собирательных протоках). Выраженность изменений пролиферативно-апоптотического соотношения прямо пропорционально дозе облучения. Аскорбиновая кислота обеспечивает пролиферативно-апоптотический баланс.

5. Однократное локальное облучение почки электронами в дозе 2 Гр и дозе 8 Гр, оцененное с помощью TUNEL метода, указывает на увеличение количества TUNEL-позитивных клеток в структурах почки (2 Гр –  $7 \pm 3$  клетки; 8 Гр –  $23 \pm 5$  клеток). Введение аскорбиновой кислоты способствовало значительному снижению количества TUNEL-позитивных клеток (2 Гр –  $3 \pm 2$  клетки; 8 Гр –  $12 \pm 4$  клеток), что подтверждает ее репаративный потенциал, поддерживающий клеточный гомеостаз и защищающий ДНК от радиационно-индуцированной фрагментации.

6. Однократное локальное облучение почки электронами в дозе 2 Гр и дозе 8 Гр приводит к повышению концентрации провоспалительных цитокинов – ИЛ-1 $\beta$  (2 Гр –  $57,2 \pm 1,8$  пг/мл, 8 Гр –  $94,3 \pm 8,7$  пг/мл), ИЛ-6 (2 Гр –  $96,7 \pm 4,6$  пг/мл, 8 Гр –  $109,0 \pm 7,7$  пг/мл), и ФНО- $\alpha$  (2 Гр –  $67,4 \pm 7,9$  пг/мл, 8 Гр –  $116,5 \pm 16,9$  пг/мл) и компенсаторному повышению противовоспалительного ИЛ-10 (2 Гр –  $22,6 \pm 2,0$  пг/мл, 8 Гр –  $35,7 \pm 3,1$  пг/мл) в сыворотке крови. Введение аскорбиновой кислоты способствует поддержанию баланса концентрации цитокинов в сыворотке крови, что отражает ее модулирующее воздействие на воспалительный ответ.

7. Однократное локальное облучение почки электронами в дозе 2 Гр и дозе 8 Гр приводит к увеличению количества IL-1- (2 Гр – увеличение в 4,5 раза; 8 Гр – в 18,2 раза), IL-6 (2 Гр – в 4,0 раза; 8 Гр – в 13,7 раза), TNF- $\alpha$  -позитивных

клеток (2 Гр – в 3,6 раза; 8 Гр – в 11,3 раза) и компенсаторному повышению количества IL-10- (2 Гр – увеличение в 2,4 раза; 8 Гр – в 2,7 раза), IL-4-позитивных клеток (2 Гр – увеличение в 1,8 раза; 8 Гр – в 2,4 раза). Аскорбиновой кислота обеспечивает баланс про- и противовоспалительных цитокинов преимущественно в сосудистых клубочках почки.

8. Однократное локальное облучение почки электронами в дозе 8 Гр активирует фиброгенез, характеризующийся разрастанием коллагеновых волокон (усиление интенсивности окрашивания трихромом по Массону) в интерстициальной ткани. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты способствует замедлению разрастания волокон в почке, что снижает степень фиброзирования.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. При назначении лучевой терапии злокачественных новообразований почки, органов брюшной полости, забрюшинного пространства и малого таза, необходимо учитывать обратимые (однократно, 2 Гр) и условно пограничные (однократно, 8 Гр) лучевые повреждения структур почек после локального облучения электронами; отдельно следует подчеркнуть профилактические меры в отношении почечной недостаточности.

2. В радиобиологической, онкологической и урологической практике при назначении электронотерапии следует учитывать дозозависимое развитие радиационно-индуцированного фиброза с целью возможной его протекции и профилактики, а морфологическая оценка постлучевого состояния гломерулярного аппарата почки может быть использована в работе врача-патологоанатома.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АК – аскорбиновая кислота
- АФК – активные формы кислорода
- ГЛУ (англ. GSH) – глутатиона (англ. Glutathione)
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИГХ – иммуногистохимия (исследование / метод)
- ИИ – ионизирующее излучение
- ИЛ (IL) – интерлейкины
- ЛП – лучевые повреждения
- ЛТ – лучевая терапия
- МДА (англ. MDA) – малоновый диальдегид (англ. Malondialdehyde)
- ОС – оксидативный стресс
- РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система
- РИФ – радиационно-индуцированный фиброз
- РОД – разовая очаговая доза
- РФА – реактивные формы азота
- СОД – суммарная очаговая доза
- СуОД (англ. SOD) – супероксиддисмутаза (англ. Superoxide dismutase)
- ФНО- $\alpha$  – фактор некроза опухоли- $\alpha$ ; англ. TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor Alpha)
- ВАХ – белок, связанный с апоптозом (Bcl-2)
- BCL-2 – В-клеточная лимфома 2, маркер
- САТ – каталаза
- GPx – глутатионпероксидаза
- GSSG-R – глутатионредуктаза
- GST – глутатион-S-трансфераза
- ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии-1
- iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота
- NF- $\kappa$ B – транскрипционный ядерный фактор- $\kappa$ B,
- NLRP3 – цитозольный белок NLRP3

NRF-2 – ядерный фактор, ассоциированный с эритроидным фактором 2

SASP (англ. Senescence-Associated Secretory Phenotype) – ассоциированный с клеточным старением секреторный фенотип

SVCTs – натрий-зависимые транспортёры витамина С

TGF- $\beta$  – трансформирующий фактор роста- $\beta$

VCAM – васкулярная молекула клеточной адгезии

VEGF – васкулярно-эндотелиальным фактором роста

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аникин Д.А., Соловьева И.А., Демко И.В., Собко Е.А., Крапошина А.Ю., Гордеева Н.В. Свободнорадикальное окисление как патогенетическое звено метаболического синдрома. Ожирение и метаболизм. 2022;19(3):306-316.
2. Аклеев А.В., Пушкарев С.А. Роль апоптоза и репарации ДНК в формировании адаптивного ответа у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. Вестник Южно-Уральского государственного гуманитарно-педагогического университета, no. 11, 2008, pp. 273-281.
3. Белоногов Р.Н., Титова Н.М., Дыхно Ю.А., Лапешин П.В., Кудряшова Е.В., Савченко А.А. Окислительная модификация белков и липидов плазмы крови больных раком легкого. Сибирский онкологический журнал, no. 4, 2009, pp. 48-51.
4. Вадюхин М.А., Демяшкин Г.А., Шаповалова Е.Ю., Марукян А.Х. Морфофункциональные изменения кожи после однократного и фракционного локального облучения электронами. Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины, vol. 12, no. 4, 2022, pp. 11-15.
5. Всемирная организация здравоохранения. (2024). Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing-amidst-mounting-need-for-services>.
6. Демяшкин Г.А., Урусханова Ж.Э., Корякин С.Н., Паршенков М.А., Дубовая Т.К., Родионова Г.М., Щекин В.И., Ивченко Ю.В., Ионова О.В. Особенности пролиферации и апоптоза в клетках сосудистых клубочков и нефроцитов после локального облучения электронами и введения аскорбиновой кислоты. Морфология. 2024;162(1):16-30.
7. Демяшкин, Г. А. Морфологический анализ сперматогенеза – основа диагностики мужского идиопатического бесплодия (иммуногистохимический аспект): специальность 14.03.02 "Патологическая анатомия": диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Г. А. Демяшкин. – Москва, 2017. – 142 с.

8. Демяшкин, Г. А. Сперматогенез: внутригонадные механизмы регуляции, их нарушения в модели локального  $\beta$ -облучения семенников, реабилитация экзогенными факторами роста тромбоцитов: специальность 1.5.22. «Клеточная биология», 3.3.2. «Патологическая анатомия»: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Г. А. Демяшкин. – Москва, 2023. – 266 с.

9. Морфофункциональная характеристика печени после введения аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита / Г. А. Демяшкин, В. А. Якименко, М. А. Вадюхин [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 134-140.

10. Особенности пролиферации и апоптоза клеток поджелудочной железы после введения N-ацетилцистеина в модели острого постлучевого панкреатита / Г. А. Демяшкин, Д. А. Атякшин, Д. И. Угурчиева [и др.] // Молекулярная медицина. – 2024. – Т. 22, № 3. – С. 40-44.

11. Характеристика стромального компонента печени после введения аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита// Г.А. Демяшкин, В.А. Якименко, М.А. Вадюхин, Д.И. Угурчиева, С.Н. Корякин // Биомедицина. – 2024. – Т. 20, № 4. – С. 70-77.

12. Особенности эндокринного аппарата поджелудочной железы после введения n-ацетилцистеина в модели острого постлучевого панкреатита / Г. А. Демяшкин, Д. И. Угурчиева, В. А. Якименко, М. А. Вадюхин // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2024. – № 2. – С. 166-175.

13. Зенков Н.К., Чечушков А.В., Кожин П.М., Мартинович Г.Г., Кандалинцева Н.В., Меньщикова Е.Б. Аутофагия как механизм защиты при окислительном стрессе. Бюллетень сибирской медицины. 2019;18(2):195-214. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-195-214>.

14. Ильина И.Ю., Доброхотова Ю.Э. Роль окислительного стресса в развитии гинекологических заболеваний. Акушерство и гинекология. 2021;(2):150-156.

15. Кафаров Э.С., Зенин О.К. Новая концепция зонального и сегментарного строения почки человека. Морфологические ведомости, vol. 30, no. 3, 2022, pp. 56-65.

16. Колина И.Б., Бобкова И.Н. Поражение почек при злокачественных образованиях. Клиницист, no. 2, 2014, pp. 7-16.

17. Корякин, Сергей, и др. Морфофункциональные особенности почки после введения аскорбиновой кислоты в модели острой лучевой нефропатии. Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024.

18. Козловский В.И., Акулёнок А.В. Активация лейкоцитов, роль в повреждении эндотелия и развитии сердечно-сосудистой патологии. Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2005;4(2):5-13.

19. Муркамилов И.Т., Сабиров И.С., Кудайбергенова И.О., Фомин В.В., Юсупов Ф.А. Нефропатии, индуцированные лечением опухолей: клинико–патогенетические аспекты. The Scientific Heritage, no. 56-2, 2020, pp. 45-52.

20. Паршенков М.А., Корякин С.Н., Урусханова Ж.Э., Петрусевич Д.А., Сквородко П.П., Анурова М.Н., Родионова Г.М., Миронцев А.В., Ростовская В.В., Джандарова Т.И., Демяшкин Г.А. Роль цитокинов и апоптоза после введения аскорбиновой кислоты в модели острой лучевой нефропатии. Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2024;14(2):26-39.

21. Трофимова О.П., Ткачев С.И., Юрьева Т.В. Прошлое и настоящее лучевой терапии в онкологии. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика, vol. 6, no. 4, 2013, pp. 355-364.

22. Пролиферация и апоптоз гепатоцитов крыс после локального облучения электронами / В. А. Якименко, Д. И. Угурчиева, М. А. Вадюхин, Г. А. Демяшкин // Молодежный инновационный вестник. – 2024. – Т. 13, № 2. – С. 143-144.

23. Allum AJ, Mussallem JT, Froning CE, Haskins AH, Buckner MA, Miller CD, Kato TA. Ascorbic Acid 2-Glucoside Pretreatment Protects Cells from Ionizing Radiation, UVC, and Short Wavelength of UVB. Genes (Basel). 2020;11(3):238.

24. Anipsitakis GP, Dionysiou DD. Radical generation by the interaction of transition metals with common oxidants. *Environ Sci Technol*. 2004;38(13):3705-3712.
25. Aratani S, Tagawa M, Nagasaka S, Sakai Y, Shimizu A, Tsuruoka S. Radiation-induced premature cellular senescence involved in glomerular diseases in rats. *Sci Rep*. 2018;8(1):16812. Published 2018 Nov 14.
26. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*. 1989;6(6):593-597.
27. Banff Classification for Renal Allograft Pathology. The Banff Foundation. – 2019. – URL: <https://banfffoundation.org/central-repository-for-banff-2019-resources-2/> (дата обращения: 06.09.2025).
28. Bahrayni Toosi MT, Kasiri A, Torabinejad S, Soleymanifard S, Sankian M, Aledavood SA, Hosseini Shamili F, Lavi F. Preliminary Results of the Effects of Localized High-Dose Radiotherapy Combined with Total Body Low-Dose Irradiation on Tumor Growth and Stimulating the Immune System in Tumor-Bearing Mice. *J Biomed Phys Eng*. 2023;13(4):323-332.
29. Bernardes de Jesus B, Blasco MA. Assessing cell and organ senescence biomarkers. *Circ Res*. 2012;111(1):97-109. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247866; Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:685-705.
30. Bertoni I, Soares MF, Roberts ISD, Connor T. Radiation nephropathy is associated with a glomerular thrombotic microangiopathy and progression to end-stage kidney disease. *Clin Kidney J*. 2023;16(9):1534-1537. Published 2023 Jun 1.
31. Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell*. 2017;66(6):801-817.
32. Borzouei S, Shabestani Monfared A, Ghorbani H, et al. Combined Effects of Radiofrequency Electromagnetic Fields and X-Ray in Renal Tissue and Function. *Res Rep Urol*. 2020;12:527-532.
33. Buffi N, Cardone P, Lughezzani G. *Renal Anatomy and Physiology*. 2018. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-65657-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-65657-1_1).

34. Burnasheva EV, Shatokhin YV, Snezhko IV, Matsuga AA. Kidney injury in cancer therapy. *Nephrology*.
35. Chang F, Lee J, Navolanic P, Steelman L, Shelton J, Blalock W, Franklin R, McCubrey J. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*. 2003;17:590-603.
36. Choi SE, Fogo AB, Lim BJ. Histologic evaluation of activity and chronicity of lupus nephritis and its clinical significance. *Kidney Res Clin Pract*. 2023 Mar;42(2):166-173.
37. Chung S, Overstreet JM, Li Y, et al. TGF- $\beta$  promotes fibrosis after severe acute kidney injury by enhancing renal macrophage infiltration. *JCI Insight*. 2018;3(21):e123563. Published 2018 Nov 2.
38. Cohen EP, Fish BL, Moulder JE. The renin-angiotensin system in experimental radiation nephropathy. *J Lab Clin Med*. 2002;139(4):251-257.
39. Cohen EP, Irving AA, Drobyski WR, et al. Captopril to mitigate chronic renal failure after hematopoietic stem cell transplantation: a randomized controlled trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008;70(5):1546-1551.
40. Cohen E, Premuzic T, Cohen A. Radiation nephropathy: Dose, management, and population risk. *J Onco-Nephrol*. 2021;6:23-28.
41. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;31(5):1341-1346.
42. Czarna M, Jarmuszkiewicz W. Rola mitochondriów w wytwarzaniu i usuwaniu reaktywnych form tlenu; związek z przesyłaniem sygnałów i programowana śmierć komórki [Role of mitochondria in reactive oxygen species generation and removal; relevance to signaling and programmed cell death]. *Postepy Biochem*. 2006;52(2):145-156.
43. Dawson LA, Kavanagh BD, Paulino AC, Das SK, Miften M, Li XA, Pan C, Ten Haken RK, Schultheiss TE. Radiation-associated kidney injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;76(3):108-115.

44. Deepika, Maurya PK. Health Benefits of Quercetin in Age-Related Diseases. *Molecules*. 2022;27(8):2498. Published 2022 Apr 13. doi:10.3390/molecules27082498.
45. Delaney T. Fine Tuning the Radiation Treatment for Extremity Soft Tissue Sarcomas. *Ann Surg Oncol*. 2018;25:3785-3786.
46. Demyashkin, G.; Koryakin, S.; Parshenkov, M.; Skovorodko, P.; Vadyukhin, M.; Uruskhanova, Z.; Stepanova, Y.; Shchekin, V.; Mirontsev, A.; Rostovskaya, V.; et al. Morphofunctional Features of Glomeruli and Nephrons After Exposure to Electrons at Different Doses: Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis. *Curr. Issues Mol. Biol*. 2024, 46, 12608–12632.
47. Dos Santos AF, Prado FCR, de Paula Novaes C, de Magalhães AC, Deboni MCZ, Corrêa L. Simultaneous irradiation of 660 and 808 nm on gingival epithelial cells and fibroblasts induces different patterns of oxidative/antioxidative activities: What is the role of the cell type and irradiation parameters? *Photochem Photobiol*. 2023 Nov 27.
48. El-Sonbaty SM, Moawed FSM, Elbakry MMM. Amphora algae with low-level ionizing radiation exposure ameliorate D-galactosamine-induced inflammatory impairment in rat kidney. *Environ Toxicol*. 2021;36(4):451-459.
49. Enriquez-Rios V, Dumitrache LC, Downing SM, et al. DNA-PKcs, ATM, and ATR Interplay Maintains Genome Integrity during Neurogenesis. *J Neurosci*. 2017;37(4):893-905.
50. Fass D, Thorpe C. Chemistry and Enzymology of Disulfide Cross-Linking in Proteins. *Chem Rev*. 2018;118(3):1169-1198. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00123.
51. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-E386.
52. Ferreira da SILVA F. Electron and Photon Interactions with Bio (Related) Molecules. *Int J Mol Sci*. 2022;23(24):15491. Published 2022 Dec 7.
53. Fischer N, Seo EJ, Efferth T. Prevention from radiation damage by natural products. *Phytomedicine*. 2018;47:192-200.
54. François A, MIIlliat F, Guipaud O, Benderitter M. Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa. *Biomed Res Int*. 2013;2013:123241.

55. Fujii Y, Kato TA, Ueno A, Kubota N, Fujimori A, Okayasu R. Ascorbic acid gives different protective effects in human cells exposed to X-rays and heavy ions. *Mutat Res.* 2010;699(1-2):58-61. doi:10.1016/j.mrgentox.2010.04.003.
56. Gavathiotis E, Reyna DE, Bellairs JA, Leshchiner ES, Walensky LD. Direct and selective small-molecule activation of proapoptotic BAX. *Nat Chem Biol.* 2012;8(7):639-645.
57. Glatstein E, Fajardo LF, Brown JM. Radiation injury in the mouse kidney—I. Sequential light microscopic study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1977;2(9-10):933-943.
58. Gluba-Brzózka A, Rysz J, Ławiński J, Franczyk B. Renal Cell Cancer and Obesity. *Int J Mol Sci.* 2022;23(6):3404.
59. González E, Cruz M, Sánchez P, Ávila I. Evidence that the radioprotector effect of ascorbic acid depends on the radiation dose rate. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2018;62:210-214.
60. Hellweg CE, Spitta LF, Koch K, Chishti AA, Henschenmacher B, Diegeler S, Konda B, Feles S, Schmitz C, Berger T, et al. The Role of the Nuclear Factor  $\kappa$ B Pathway in the Cellular Response to Low and High Linear Energy Transfer Radiation. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2220.
61. He Y, Sun MM, Zhang GG, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):425. Published 2021 Dec 16.
62. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(2):150-166.
63. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer.* 2013;12:86. Published 2013 Aug 2.
64. Hou FF, Boyce J, Zhang Y, Owen WF Jr. Phenotypic and functional characteristics of macrophage-like cells differentiated in pro-inflammatory cytokine-containing cultures. *Immunol Cell Biol.* 2000;78(3):205-213.
65. Humphreys BD. Mechanisms of Renal Fibrosis. *Annu Rev Physiol.* 2018;80:309-326.

66. Hye Khan MA, Fish B, Wahl G, et al. Epoxyeicosatrienoic acid analogue mitigates kidney injury in a rat model of radiation nephropathy. *Clin Sci (Lond)*. 2016;130(8):587-599.
67. Ighodaro O, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med*. 2018;54:287-293.
68. Intarasit S, Saengniji K. Transient production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO induced by ascorbic acid coincides with promotion of antioxidant enzyme activity and reduction of pericarp browning of harvested longan fruit. *Scientia Horticulturae*. 2021;277:109784.
69. Jagetia GC, Baliga MS, Venkatesh P. Alteration in the glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation by ascorbic acid in the skin of mice exposed to fractionated gamma radiation. *Clin Chim Acta*. 2003;332(1-2):111-121.
70. Jafari Anarkooli I, Sankian M, Vahedi F, Bonakdaran S, Varasteh AR, Haghiri H. Evaluation of insulin and ascorbic acid effects on expression of Bcl-2 family proteins and caspase-3 activity in hippocampus of STZ-induced diabetic rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2009;29(1):133-140.
71. Janko M, Ontiveros F, Fitzgerald TJ, Deng A, DeCicco M, Rock KL. IJ1-1 generated subsequent to radiation-induced tissue injury contributes to the pathogenesis of radiodermatitis. *Radiat Res*. 2012;178(3):166–172.
72. Kerr C, Bates A, Grudzinski J, Ferreira C, Sheehan-Klenk J, Adam D, Powers M, Jin W, Jagodinsky J, Sriramaneni R, Clark P, Zangl L, Pinchuk A, Onate A, Kumari R, Choi C, Massey C, Bednarz B, Hernandez R, Weichert J, Morris Z. Abstract 1306: Radionuclide-specific effects of <sup>90</sup>Y-, <sup>177</sup>Lu-, or <sup>225</sup>Ac-NM600 targeted radionuclide therapy on tumor immunomodulation and enhancing immunotherapy response in murine tumor models. *Cancer Res*. 2022.
73. Kim YJ, Palmer LD, Lee W, Heller NJ, Cushing SK. Using electron energy-loss spectroscopy to measure nanoscale electronic and vibrational dynamics in a TEM. *J Chem Phys*. 2023;159(5):050901.

74. Kokurewicz K, Brunetti E, Curcio A, Gamba D, Garolfi L, GIJardi A, Senes E, Sjobak K, Farabolini W, Corsini R, Jaroszynski D. An experimental study of focused very high energy electron beams for radiotherapy. *Commun Phys*. 2021;4:1-7.
75. Knoll I, Quevedo A, Sánchez M. Applications of simulation codes based on Monte Carlo method for Radiotherapy. *The Monte Carlo Methods - Recent Advances, New Perspectives and Applications*. 2022.
76. Kruijff RM, Raavé R, Kip A, et al. The in vivo fate of  $^{225}\text{Ac}$  daughter nuclides using polymersomes as a model carrier. *Sci Rep*. 2019;9(1):11671.
77. Kvietys PR, Granger DN. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(3):556-592.
78. Lafargue A, Degorre C, Corre I, et al. Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation. *Free Radic Biol Med*. 2017;108:750-759.
79. Lenarczyk M, Cohen EP, Fish BL, et al. Chronic oxidative stress as a mechanism for radiation nephropathy. *Radiat Res*. 2009;171(2):164-172.
80. Liakopoulos V, Roumeliotis S, Bozikas A, Eleftheriadis T, Dounousi E. Antioxidant Supplementation in Renal Replacement Therapy Patients: Is There Evidence?. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:9109473. Published 2019 Jan 15.
81. Linard C, Marquette C, Mathieu J, Pennequin A, Clarençon D, Mathé D. Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;58(2):427-434.
82. Liu Y, Lu X, Nguyen S, Olson JL, Webb HK, Kroetz DL. Epoxyeicosatrienoic acids prevent cisplatin-induced renal apoptosis through a p38 mitogen-activated protein kinase-regulated mitochondrial pathway. *Mol Pharmacol*. 2013;84(6):925-934.
83. Lukens JN, Gamez M, Hu K, Harrison LB. Modern brachytherapy. *Semin Oncol*. 2014;41(6):831-847.
84. McRobb LS, McKay MJ, Gamble JR, et al. Ionizing radiation reduces ADAM10 expression in brain microvascular endothelial cells undergoing stress-induced senescence. *Aging (Albany NY)*. 2017;9(4):1248-1268.

85. Menda Y, Madsen M, O'Dorisio T, Sunderland J, Watkins G, Dillon J, Mott S, Schultz M, Zamba G, Bushnell D, O'Dorisio M. 90Y-DOTATOC Dosimetry–Based Personalized Peptide Receptor Radionuclide Therapy. *J Nucl Med.* 2018;59:1692-1698.
86. Mercantepe T, Topcu A, Rakici S, Tumkaya L, Yilmaz A, Mercantepe F. The radioprotective effect of N-acetylcysteine against x-radiation-induced renal injury in rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019;26(28):29085-29094.
87. Mikhed Y, Görlach A, Knaus UG, Daiber A. Redox regulation of genome stability by effects on gene expression, epigenetic pathways and DNA damage/repair. *Redox Biol.* 2015;5:275-289.
88. Mikirova N, Casciari J, Riordan N, Hunninghake R. Anti-angiogenic effect of high doses of ascorbic acid. *J Transl Med.* 2008;6:50. doi:10.1186/1479-5876-6-50.
89. Morel C, Carlson SM, White FM, Davis RJ. Mcl-1 integrates the opposing actions of signaling pathways that mediate survival and apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2009;29(14):3845-3852.
90. Napolitano G, Fasciolo G, Venditti P. Mitochondrial Management of Reactive Oxygen Species. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(11):1824. Published 2021 Nov 17.
91. Okunieff P, Lee MT, Kung JH, Darga T, Auger EA, Mills SE, Kinsella TJ. Toxicity, radiation sensitivity modification, and combined drug effects of ascorbic acid with misonidazole in vivo on FSaII murine fibrosarcomas. *J Natl Cancer Inst.* 1987;79(2):377-381.
92. Parihar AS, Chopra S, Prasad V. Nephrotoxicity after radionuclide therapies. *Transl Oncol.* 2022;15(1):101295.
93. Peter RU. Diagnosis and treatment of cutaneous radiation injuries. *Radiation Treatment and Radiation Reactions in Dermatology.* 2015. pp. 185–188.
94. Sakaguchi N, Miyai K, Sakaguchi S. Ionizing radiation and autoimmunity: Induction of autoimmune disease in mice by high dose fractionated total lymphoid irradiation and its prevention by inoculating normal T cells. *J Immunol.* 1992;152(5):2586-2595.

95. Schultz-Hector S, Balz K. Radiation-induced loss of endothelial alkaline phosphatase activity and development of myocardial degeneration. An ultrastructural study. *Lab Invest.* 1994;71(2):252-260.

96. Shaban NZ, Ahmed Zahran AM, El-Rashidy FH, Abdo Kodous AS. Protective role of hesperidin against  $\gamma$ -radiation-induced oxidative stress and apoptosis in rat testis. *J Biol Res (Thessalon).* 2017;24:5. Published 2017 Mar 1.

97. Singh V, Gupta D, Arora R. NF- $\kappa$ B as a key player in regulation of cellular radiation responses and identification of radiation countermeasures. *Discoveries (Craiova).* 2015 Mar 31;3(1):e35. doi:10.15190/d.2015.27.

98. Stephens LC, Robbins ME, Johnston DA, et al. Radiation nephropathy in the rhesus monkey: morphometric analysis of glomerular and tubular alterations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995;31(4):865-873.

99. Sundar IK, Caito S, Yao H, Rahman I. Oxidative stress, thiol redox signaling methods in epigenetics. *Methods Enzymol.* 2010;474:213-244.

100. Su YC, Lee WC, Wang CC, Yeh SA, Chen WH, Chen PJ. Targeting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway as a Radiosensitization in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 12;23(24):15749.

101. Tampe D, Schridde L, Korsten P, et al. Different Patterns of Kidney Fibrosis Are Indicative of Injury to Distinct Renal Compartments. *Cells.* 2021;10(8):2014. Published 2021 Aug 6.

102. Tian X, Geng J, Zheng Q, et al. Single high dose irradiation induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells through the Ras/Raf/MEK/ERK pathways. *Int J Radiat Biol.* 2020;96(6):740-747.

103. Tsai CJ, Chu G. Cooperative assembly of a protein-DNA filament for nonhomologous end joining. *J Biol Chem.* 2013;288(25):18110-18120.

104. Tsai CS, Chen FH, Wang CC, et al. Macrophages from irradiated tumors express higher levels of iNOS, arginase-I and COX-2, and promote tumor growth. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007;68(2):499-507.

105. Tshephe TS, Akinwamide SO, Olevsky E, Olubambi PA. Additive manufacturing of titanium-based alloys- A review of methods, properties, challenges, and prospects. *Heliyon*. 2022;8(3):e09041. Published 2022 Mar 7.

106. Upadhyay R, Bazan JG. Advances in Radiotherapy for Breast Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2023;32(3):515-536.

107. Verheij M, Dewit LG, Valdés Olmos RA, Arisz L. Evidence for a renovascular component in hypertensive patients with late radiation nephropathy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994;30(3):677-683.

108. van Kleef EM, Zurcher C, Oussoren YG, et al. Long-term effects of total-body irradiation on the kidney of Rhesus monkeys. *Int J Radiat Biol*. 2000;76(5):641-648.

109. Wang C, Lees-MILLer SP. Detection and repair of ionizing radiation-induced DNA double strand breaks: new developments in nonhomologous end joining. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013;86(3):440-449.

110. Wang Q, Zhou Y, Wang X, Evers BM. Glycogen synthase kinase-3 is a negative regulator of extracellular signal-regulated kinase. *Oncogene*. 2006;25(1):43-50.

111. Wang X, Chen J, Xu J, Xie J, Harris DCH, Zheng G. The Role of Macrophages in Kidney Fibrosis. *Front Physiol*. 2021;12:705838. Published 2021 Aug 6.

112. Webster A, Nagler E, Morton R, Masson P. Chronic Kidney Disease. *The Lancet*. 2017;389:1238-1252.

113. Wenzel U, Nickel A, Kuntz S, Daniel H. Ascorbic acid suppresses drug-induced apoptosis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. *Carcinogenesis*. 2004;25(5):703-712.

114. Wick G, Grundtman C, Mayerl C, et al. The immunology of fibrosis. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:107-135.

115. Yang T, Xu C. Physiology and Pathophysiology of the Intrarenal Renin-Angiotensin System: An Update. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(4):1040-1049.

116. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest.* 2001;107(2):135-142.

117. Yumusak N, Sadic M, Yucel G, Atılgan HI, Koca G, Korkmaz M. Apoptosis and cell proliferation in short-term and long-term effects of radioiodine-131-induced kidney damage: an experimental and immunohistochemical study. *Nucl Med Commun.* 2018;39(2):131-139.

118. Zhang F, Liu H, Liu D, et al. Effects of RAAS Inhibitors in Patients with Kidney Disease. *Curr Hypertens Rep.* 2017;19(9):72.

119. Zhang Y, Huang Y, Li Z, Wu H, Zou B, Xu Y. Exploring Natural Products as Radioprotective Agents for Cancer Therapy: Mechanisms, Challenges, and Opportunities. *Cancers (Basel).* 2023;15(14):3585.

120. Zhao W, Chuang EY, Mishra M, et al. Distinct effects of ionizing radiation on in vivo murine kidney and brain normal tissue gene expression. *Clin Cancer Res.* 2006;12(12):3823-3830.

121. Zhitkovich A. N-Acetylcysteine: Antioxidant, Aldehyde Scavenger, and More. *Chem Res Toxicol.* 2019;32(7):1318-1319.

122. Zhen H, Takahashi A, Yamamoto H, Nakamura Y. Attenuation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis by X-ray irradiation in human umbilical vein endothelial cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011;81(2):658-664.

123. Zhou Q, Liao JK. Statins and cardiovascular diseases: from cholesterol lowering to pleiotropy. *Curr Pharm Des.* 2009;15(5):467-478.

124. Zobel C, Läubli N, Brändle M, Jörg L, Haile SR, Frey BM, Kuhlmann U, Thiel MA. Evaluation of ocular surface damage in patients with dry eyes after radioiodine therapy. *PLoS One.* 2020;15(1):e0227835.

125. Zuluaga-Ramírez V, El-Hassan W, Martinez-Ferrando MI, et al. Dose Optimization for Renal Sparing During External Beam Radiotherapy in Hodgkin Lymphoma: Clinical and Dosimetric Predictors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2021;109(2):509-520.

126. Zürcher C, Oussoren YG, Schenk I, et al. Renal toxicity after total body irradiation and hematopoietic stem cell transplantation in rhesus monkeys: A retrospective study. *Int J Radiat Biol.* 2011;87(5):518-524.

127. Zuo L, Youtz DJ, Wold LE. Particulate matter exposure exacerbates high glucose-induced endothelial cell injury through ROS generation. *PLoS One.* 2011;6(8):e23116.

128. Zygogianni A, Kyrgias G, Kouvaris J, et al. Role of radiotherapy in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Hippokratia.* 2012;16(2):110-115.

129. Zhang Y, Huang Y, Li Z, Wu H, Zou B, Xu Y. Exploring Natural Products as Radioprotective Agents for Cancer Therapy: Mechanisms, Challenges, and Opportunities. *Cancers (Basel).* 2023;15(14):3585.

130. Zhao W, Chuang EY, Mishra M, et al. Distinct effects of ionizing radiation on in vivo murine kidney and brain normal tissue gene expression. *Clin Cancer Res.* 2006;12(12):3823-3830.

131. Zhitkovich A. N-Acetylcysteine: Antioxidant, Aldehyde Scavenger, and More. *Chem Res Toxicol.* 2019;32(7):1318-1319.