

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова
Федерального медико-биологического агентства»
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт гриппа имени
А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

СИВАК

Константин Владимирович

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ НОВЫХ ПОДХОДОВ
К ДИАГНОСТИКЕ И ФАРМАКОТЕРАПИИ
ТОКСИЧЕСКИХ НЕФРОПАТИЙ

3.3.4. Токсикология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант
Саватеева-Любимова Татьяна Николаевна,
доктор медицинских наук, профессор

Санкт-Петербург – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	16
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ТОКСИЧЕСКИХ НЕФРОПАТИЯХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	16
1.1 Эпидемиология и этиология нефропатий токсического генеза.....	16
1.2 Патогенез нефропатий токсического генеза.....	22
1.3 Современные методы изучения нефротоксичности	42
1.4 Современные методы терапии нефропатий токсического генеза	65
1.5 Заключение к обзору литературы.....	77
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	81
2.1 Материалы исследования	81
2.2 Методы исследования.....	86
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ НОВЫХ ПОДХОДОВ К ДИАГНОСТИКЕ ТОКСИЧЕСКИХ НЕФРОПАТИЙ.....	111
3.1 Разработка новых критериев оценки развития токсических нефропатий	115
3.2 Функциональные изменения почек в диагностике токсических нефропатий	154
3.3 Морфологические изменения почек в диагностике токсических нефропатий	166
3.4 Заключение к главе 3	182
ГЛАВА 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ФАРМАКОТЕРАПИИ ТОКСИЧЕСКИХ НЕФРОПАТИЙ.....	184
4.1 Скрининг перспективных средств терапии токсических нефропатий	184
4.2 Изучение антидотных свойств гидрокарбоната натрия при перитонеальном диализе.....	196
4.3 Изучение детоксицирующих свойств диметилноксобутилфосфонилдиметилата.....	202
4.4 Изучение эффективности фитопрепаратов при токсических нефропатиях	205
4.5 Заключение к главе 4	208
ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	212
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	222
ВЫВОДЫ.....	224
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	226
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	227
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	234

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Согласно данным ВОЗ в Российской Федерации смертность от неумышленных отравлений (2015) превышает среднемировой уровень на 40%, а от умышленных – на 61% (2005-2015) [29, 47]. По данным Департамента мониторинга, анализа и стратегического развития здравоохранения Министерства здравоохранения Российской Федерации и «Центрального научно-исследовательского института организации и информатизации здравоохранения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Москва, 2019), число отравлений лекарственными средствами, медицинскими и биологическими веществами, а также веществами немедицинского назначения на 100 тыс. населения составило 64,4 в 2017 г. (94513 абс.) и 69,0 в 2018 г. (101407 абс.). Острые экзогенные отравления системными ядами (токсичные металлы, хлорорганические растворители, уксусная кислота, этиленгликоль, диэтиленгликоль, 3-монохлорпропан-1,2-диол), лекарственными средствами с нефротоксическим потенциалом (аминогликозиды, ванкомицин, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), химиопрепараты) и природными нефротоксинами (яды змей, колхицин, аристолохиевые и дженколевая кислоты, грибные токсины), а также веществами, вызывающими рабдомиолиз (судорожные яды, снотворные), могут обуславливать развитие ренального фенотипа диффузного двустороннего острого повреждения почек (ОПП) – частного и наиболее типичного варианта токсической нефропатии, а также быть причиной тубулоинтерстициального нефрита (ТИН) с исходом в нефрофиброз (ТИФ) или нефрогенный системный фиброз [41, 43, 48, 53, 55, 56, 63, 71, 142, 185, 195, 297, 303, 304, 470, 581, 593].

Почечно-специфическими факторами риска развития токсических нефропатий являются: высокая скорость почечного кровотока, относительно гипоксическая среда, повышенная концентрация лекарств/токсинов в мозговом веществе почек и интерстиции, биотрансформация лекарств/токсинов с образованием активных форм кислорода (АФК), высокая скорость метаболизма канальцевых клеток в петле Генле, поглощение белков апикальными мембранами канальцев путём эндоцитоза, базолатеральный тубулярный транспорт ксенобиотиков через транспортёры органических катионов и анионов [471].

Частота ОПП 1-2 стадии составляет от 2 до 3 тысяч на 1 млн. населения, 2/5 из которых требует диализного лечения и составляет 80% всех больных с ОПП [55]. Ренальная форма составляет 25-40% всех случаев ОПП и этиологическими факторами выступают: токсическое поражение клубочков и эпителия почечных канальцев прямыми нефротоксинами, внутриканальцевая обструкция патологическими цилиндрами и кристаллами, некротический папиллит, лекарственный и идиопатический острый тубулоинтерстициальный нефрит, быстро прогрессирующий гломерулонефрит, микроангиопатии [55, 56].

Нефротоксичность может варьировать от минимального до значительного некроза, от изменений отдельных функций канальцев до существенной почечной недостаточности и электролитного дисбаланса. Патологические механизмы ОПП весьма разнообразны, зависят от вида токсиканта и включают в себя прямое поражение эпителия почечных канальцев (нефротелиоцитов), нарушение транспорта анионов и катионов, реабсорбции белков, воспалительную реакцию, активацию оксидативного стресса и апоптоза, различные модальности регулируемого некроза, внутриканальцевую обструкцию кристаллами [119, 154, 368, 377, 403, 462, 483, 506, 516, 555, 571].

Утрата детоксицирующих функций почек оказывает существенное влияние на сердечно-сосудистую, дыхательную и гепатобилиарную системы [28, 55, 71, 72]. ОПП токсического генеза является жизнеугрожающим состоянием, обуславливает высокий риск летального исхода (30-40%) [52, 217] и требует незамедлительной терапии [44], включающей в себя: гастроинтестинальную сорбцию [48], в 50% случаев гемодиализ [50, 55], перитонеальный диализ [24, 28, 48, 55, 60, 562] альбуминовый диализ (MARS) и плазмофильтрацию с адсорбцией и диализом (PFAD) [52, 55], а также мероприятия, направленные на поддержание эффективного почечного кровоснабжения [6, 32, 33, 61, 71] и ограничение фиброза [6, 52]. Детоксикационную терапию наиболее целесообразно начинать в токсикогенную и раннюю соматогенную фазы отравления и включать в неё специфические антидоты (например, фомепизол или этанол, стирипентол при отравлении гликолями) [13, 86, 137] и фармакотерапию (регуляторы КОС, осмотические и петлевые диуретики, антигипоксанты, нефро-, цитопротекторы и др.) [2, 3, 6, 40]. Терапия ренального фенотипа ОПП должна обеспечивать коррекцию осложнений ОПП: артериальную гипертензию, гиперволемию, дисэлектролитемию и метаболический ацидоз [6]. В тоже время, наиболее эффективной мерой профилактики развития фатальных последствий острых отравлений является ранняя диагностика – как химико-токсикологическая [14, 48, 57, 67], так и на основе биомаркеров поражения почек [235, 460, 584, 599].

Соответственно, экспериментальное обоснование новых подходов к диагностике нефропатий токсического генеза и расширения возможностей антидотной и детоксикационной терапии, является своевременным и актуальным исследованием, имеющим чрезвычайно важное социально-экономическое значение.

Степень разработанности темы. Диагностика токсических нефропатий основывается на совокупности клинических признаков и результатов лабораторных исследований. При токсических воздействиях, первоначально запускающих молекулярные изменения, происходит задержка выделения фосфатов и сульфатов с развитием метаболического ацидоза, поступление биомаркеров в кровь и мочу, а анализ динамики экскреции этих маркеров имеет существенный потенциал для разработки новых методов диагностики ОПП, недостижимый с помощью

рутинных тестов [55, 251, 252, 254, 255]. Наряду с измерением в крови клинически значимых уровней мочевины и креатинина («базовые» тесты для оценки скорости клубочковой фильтрации), необходимо проводить анализ мочи, который особенно важен для выявления повреждения канальцев. Некоторые панели тестов (белки, ферменты, маркеры метаболизма) позволяют выявлять локализацию и степень нефротоксичности. К биомаркерам в моче относят ряд ферментов, составляющих до 40% цитоплазматического содержимого нефротелия разных зон и участков нефронов [93, 171, 333, 564, 610]. К биомаркерам в крови относятся, наряду с азотистыми метаболитами (мочевинной и креатинином), фосфатидилхолины, содержание которых в крови снижается после введения нефротоксичных лекарственных средств [367].

Через один день после введения цисплатина в возрастающем диапазоне доз (2,5, 5 или 7,5 мг/кг) наблюдали увеличение уровня эктодомена Kim-1 в моче примерно в 3-5 раз [567, 568]. Выделение на ранней стадии NGAL (липокалин-2, связанный с желатиназой нейтрофилов) нефротелиоцитами в мочу сигнализирует об ОПП при отравлении паракватом [83, 252]. TIMP-2 и IGFBP7 показали наилучшую прогностическую ценность (AUC=0,86), цистатин С (CysC) в моче был вторым наиболее эффективным биомаркером (AUC=0,79), а максимальное количество доказательств было получено для NGAL с AUC=0,72 [570]. Для достижения клинической эффективности и окончательного диагноза необходимо установить пороговое значение уровня биомаркеров с высокой положительной и отрицательной прогностической ценностью. Пороговые значения NGAL в моче 150 и 300 нг/мл продемонстрировали превосходную специфичность (92,4 и 97,1%, соответственно) и отрицательную прогностическую ценность (93,3 и 92,8%, соответственно) для исключения тяжёлого ОПП [255]. Однако работ, оценивающих кинетику выделения маркеров с мочой для диагностики и прогноза течения нефропатий токсического генеза, в научной литературе представлено крайне мало. Кроме того, дисфункцию канальцев можно распознать по повышенной почечной экскреции низкомолекулярных белков, наличию зернистых цилиндров и эпителиальных клеток почечных канальцев (renal tubular epithelial cells – RTEC) в осадке мочи [461, 570], гематурии, лейкоцитурии и протеинурии на фоне приёма НПВС и анальгетиков [4], а общий анализ мочи в сочетании с микроскопией позволял понять локализацию и причину острого повреждения почек [413]. Значения ≥ 2 по системе оценки мочевого осадка (наличие любых цилиндров или RTEC) у пациентов с ОКН является чрезвычайно надёжным предиктором ОПП [470-472]. Через 4 часа после инъекции малеата натрия имело место значительное увеличение концентрации моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1) в плазме как биомаркера ОПП [473]. В другом исследовании было установлено выделение с мочой биомаркера некроптоза нефротелиоцитов – циклофилина А (CypA) [146]. В работе Готье и соавт. (2014) была оценена эффективность иммуноферментного анализа с использованием девяти одноплексных и двух

мультиплексных платформ у самцов и самок крыс линии *Sprague-Dawley*. Для некоторых биомаркеров различия между платформами составляли до 15 раз (из-за использования различных антител у разных производителей), что наряду с общей информационной недостаточностью результатов по самкам свидетельствует о необходимости дальнейших исследований [238].

Протеинурия также является следствием повреждения канальцев, клубочков и признана независимым фактором риска почечных заболеваний [309, 464]. Определение соотношения белок-креатинин в моче позволяет «исключить» наличие значительной протеинурии [484, 606], тогда как качественные тесты на протеинурию и гематурию имеют низкую чувствительность [438]. Электрофоретическое разделение является наиболее доступным методом определения качественных особенностей протеинурии [464]. Тубулярный тип протеинурии был обнаружен при различных нефропатиях, отравлениях и гипоксии [76, 148, 282, 397].

Несмотря на существование в настоящее время большого количества биомаркеров поражения почек, их общими недостатками являются: невысокая специфичность в плане разграничения острых и хронических заболеваний почек, межгосударственные различия в стандартах диагностики заболеваний, нацеленность на оценку функции почек, высокая стоимость [460]. Будущие исследования должны быть сосредоточены на изучении механизмов повреждения, с целью расширения знаний о фенотипах ОПП на основе их патофизиологии [85]. Таким образом, биомаркеры необходимы для диагностики повреждения почек при отравлениях и у пациентов, которым назначены нефротоксические препараты.

Так как нефротелиоциты являются главной мишенью для нефротоксинов, поиск и разработка нефропротекторных средств и технологий представляет собой актуальную проблему медицины, а проблема использования цитопротекторов входит в стратегическое направление современной неотложной медицины и окончательно не решена [2]. Высокая скорость почечного кровотока обеспечивает быструю доставку внутривенно вводимых препаратов к клеткам почек. Применение антигипоксанта конфумина позволяет избежать перегрузки ОЦК и снизить риск отёка лёгких [61]. Антиоксидант 4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил снижает экспрессию ядерного фактора-каппа В, циклооксигеназы-2 и фактора некроза опухоли- α в ткани почек с индуцированным цисплатином ОПП [82]. При почечной гипоксии, ишемии и воспалении высокоселективные антагонисты A_3AR [418] и агонисты A_2AR [468] ослабляют прогрессирование почечного фиброза и обладают ренопротекторным действием. Антиапоптотическая активность метаболитного препарата альфа-липоевой кислоты является ключевым механизмом снижения нефротоксичности кадмия [391], а коррекция гипоксии является многообещающей стратегией для блокирования перехода от ОПП к ХБП [549]. Метилглюкамин снижает цитотоксичность урана более чем на 70% [433]. Препараты с

антиоксидантной активностью, ингибиторы обратного захвата аминогликозидов, индукторы экскреции и блокаторы кальциевых каналов проявили значимую нефропротекцию [580]. Ингибирование некроптозного белка RIPK1 с помощью некростатина-1 (Nec-1) ослабляло гентамицин-индуцированный некроз, воспаление и фиброз почек у мышей [304]. Нефропротекторы растительного происхождения, содержащие комплексы биологически активных веществ (флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, танинов, тритерпеновых сапонинов и др.), высоко эффективны для профилактики лекарственной нефротоксичности и предотвращения трансформации ОПП в ХБП [26, 40, 70].

Анализ существующих подходов к проблеме показал, что нет единых критериев оценки степени и характера повреждений почек различными по месту действия нефротоксинами. Не существует специфических признаков острого тубулоинтерстициального нефрита или других тубулоинтерстициальных болезней почек, а подтверждающие методы диагностики (креатинин крови, клиренс креатинина и исследование мочевого осадка) регистрируют заболевание на поздней стадии функциональных и грубых морфологических изменений. Не в полной мере известны и расшифрованы также особенности механизмов повреждения нефрона и предикторы как начального повреждения почек, так и потенциальной тяжести отдалённых последствий интоксикации. Это не позволяет оптимизировать профилактику, неотложную и реабилитационную терапию токсических поражений почек. Многофакторный характер этиологии и патогенеза ОПП, функциональная неоднородность различных сегментов нефрона препятствуют достижению клинических успехов. Для больных с ОПП в 58% случаев возникает потребность в заместительной почечной терапии, чаще всего не имеющей методических различий в зависимости от причины развития ОПП [32]. Применение глюкокортикостероидов давало положительный результат в случае преобладания в инфильтратах тубулоинтерстиция нейтрофилов, не зависело от причинного токсического фактора ОТИН и практически не оказывало эффекта в случае признаков тубулоинтерстициального фиброза в одних исследованиях, а в других исследованиях не было выявлено разницы при наблюдении в течение года между группой больных с лекарственно индуцированным ТИН с применением глюкокортикоидов и симптоматической терапией [33]. Поэтому экспериментальные подходы к изучению нефропатий токсического генеза должны включать в себя моделирование, оценку степени биологического ответа на воздействие и обратимость изменений, исследование патогенеза для последующей разработки оптимальной фармакопрофилактики и терапии, в том числе заместительной почечной терапии.

Цель и задачи исследования. Цель работы – экспериментально обосновать новые подходы к диагностике патологии почек при отравлении веществами нефротоксического

действия и перспективные направления антидотной и детоксицирующей терапии токсических нефропатий.

Для достижения указанной цели предстояло решить следующие основные задачи:

1. На экспериментальных моделях отравлений различными по химической структуре нефротоксинами исследовать биохимические показатели мочи, крови и ткани почек лабораторных животных.
2. Изучить динамику изменений почечно-специфичных биомаркеров при экспериментальной нефропатии токсического генеза и оценить их прогностическую значимость.
3. Изучить профиль нарушений почечных функций и морфологических изменений при нефропатиях токсического генеза.
4. Выявить наличие взаимосвязи показателей острого повреждения почек токсического генеза в моче со степенью морфологических изменений ткани почек.
5. Разработать алгоритм диагностики нефропатий токсического генеза с использованием показателей острого повреждения почек в биожидкостях.
6. Изучить антидотные свойства гидрокарбоната натрия в составе раствора для перитонеального диализа при отравлении ураном.
7. Изучить детоксицирующие свойства диметилксобутилфосфонилдиметилата при отравлении этиленгликолем.
8. Изучить нефропротекторную активность фумарата натрия и фитопрепаратов на моделях нефропатий токсического генеза.

Научная новизна работы. Впервые предложен метод диагностики токсических нефропатий на основе кинетического подхода измерения уровня биомаркеров тканевого полипептидного антигена, липокалина-2, молекулы-1 повреждения почки, ретинол-связывающего белка-4, моноцитарного хемотаксического белка-1, трансформирующего ростового фактора бета-1 в моче. Установлена последовательность развития острого поражения почек на лабораторных животных с использованием кинетического подхода оценки экскреции биомаркеров.

Доказана связь уровней тканевого полипептидного антигена и Kim-1 в моче с долей клеток почек, погибающих по механизму апоптоза и некроза при токсической нефропатии. Обоснована связь между уровнями биомаркеров и патоморфологическими изменениями в почках лабораторных животных.

Впервые предложен способ повышения эффективности перитонеального диализа с использованием в составе диализирующего раствора гидрокарбоната натрия при остром

отравлении соединениями урана, увеличивающего перитонеальный клиренс изотопа [^{238}U] и выживаемость животных.

Установлено, что диметилксобутилфосфонилдиметилат при введении в токсикогенную фазу острой интоксикации этиленгликолем в значительной степени предотвращает развитие метаболического ацидоза с высокой анионной разницей и снижает осмотический некроз нефротелиоцитов.

Доказана нефропротекторная активность 15% раствора фумарата натрия при токсическом и ишемическом остром повреждении почек и растительных фитопрепаратов хофитол, нефрозолид, канефрон Н и композиции экстрактов золотарника, репешка и череды на экспериментальных моделях токсических нефропатий.

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате выполнения данного исследования экспериментально обоснован новый подход к диагностике нефропатий токсического генеза, способ ускорения выведения урана из организма посредством перитонеального диализа, коррекции диметилксобутилфосфонилдиметилатом метаболического ацидоза с высокой анионной разницей, ренопротекторной терапии фумаратом натрия и фитопрепаратами. Для научного обоснования впервые применены методы биоинформатического анализа в виде принципов поиска закономерности изменения уровня биомаркеров от времени и технологии расчётов. Так, впервые было установлено, что в самом раннем периоде ОПП токсического генеза свидетелем повреждения канальцев нефронов выступает ранее не идентифицированный как маркер нефротоксичности тканевой полипептидный антиген – фрагменты цитокератина 8/18,19, наряду с известным биомаркером липокалином-2. Их уровень в моче существенно превышает установленные пороговые величины, что имеет высокую прогностическую ценность. Оценена взаимосвязь уровней биомаркера фрагментов цитокератина 8/18,19 и Kim-1 в моче с долей клеток почек, погибающих по механизму апоптоза и некроза.

При изучении большого числа разнообразных нефротоксинов прямого типа действия выявлено не зависящее от пола нарушение концентрационной функции почек вследствие нарушения работы транспортных систем нефронов и микроциркуляторного русла.

На основании проведённых сравнительных исследований при токсических нефропатиях были отобраны гистоморфологические параметры оценки сосудисто-гломерулярного и тубулоинтерстициального компонентов повреждения нефронов для идентификации морфологического варианта ОПП. В работе показано превалирование тубулоинтерстициальных изменений и васкулопатий над гломерулярными на моделях токсических нефропатий.

Обосновано, что для исследования изменений состава протеома мочи под действием нефротоксинов предпочтительно использовать самок крыс из-за базально низкого уровня

выделения белка, доминирующим компонентом которого являются фрагменты лёгких цепей иммуноглобулинов. Разработанный в настоящем исследовании трёхточечный кинетический подход измерения уровней биомаркеров может быть использован для диагностики токсической нефропатии. Использование такого подхода особенно важно для мониторинга состояния почек при острых экзогенных отравлениях, поскольку позволит выявлять ранние клинические стадии, а также направление течения ОПП. По сравнению с уже известными методами диагностики токсических нефропатий (общим анализом мочи и определением азота мочевины и креатинина в крови) предложенный подход существенно отличается тем, что выявляет ранние фазы ОПП, демонстрирует большую чувствительность и специфичность, прогностическую значимость и опережает диагностику по росту сывороточного креатинина. Диагностическим критерием является превышение пороговой величины cut-off уровня показателей TPA, Kim-1, NGAL, RBP4, MCP-1 и TGF- β в моче в динамике. Сочетание методов химико-токсикологического, клинико-лабораторного, инструментального и патоморфологического исследования позволит в полной мере устанавливать диагноз ОПП токсического генеза. Применение комплекса методов обеспечит значительный социально-экономический эффект в связи со снижением инвалидизации, обусловленной ранним началом специфической терапии. Использование разработанного подхода будет способствовать благоприятным микро- и макроэкономическим эффектам – совершенствованию технологий диагностики в здравоохранении и сокращению потерь от нетрудоспособности населения Российской Федерации. Предложенный в диссертационном исследовании подход диагностики нефропатий токсического генеза является универсальным и может быть распространён на ОПП в целом. Применение разработанного подхода в экспериментальной практике позволит оптимизировать поиск нефропротекторов для целенаправленной профилактики повреждения почек.

Для практического применения разработаны и опубликованы методические рекомендации для врачей ФМБА России МР № 12.29-15 «Оценка возможности развития последствий острого и пролонгированного воздействия ураном». Опубликована монография «Тепловая ишемия почки», посвящённая проблеме острой ишемии почек, патогенетически схожей с нефропатиями токсического генеза. В работе показаны механизмы повреждения почек, дана характеристика биохимических маркеров ОПП и их изменений в условиях повреждения почек в экспериментах на кроликах и на клинических примерах, представлены результаты апробации биомаркеров Kim-1 и NGAL в мониторинге эффективности проводимой протекторной терапии. Произведена оценка эффективности применения препарата «Конфумин» в качестве средства фармакологической защиты при тепловой ишемии почки и доказано его ренопротекторное действие. Издано руководство «Доказательная фитотерапия.

Руководство для врачей и провизоров»¹, в котором отражены современные представления о месте фитотерапии в стандартах лечения наиболее широко распространённых заболеваний почек и мочевыводящих путей. В руководстве представлены экспериментальные доказательства применения лекарственных растений нефропротекторов.

Методология и методы исследования. Методология включала в себя: постановку научной проблемы, определение этапов научно-исследовательской работы; поиск, накопление и анализ научной информации; методики и планирование экспериментов; обработку результатов экспериментов; анализ полученных результатов и их теоретическую и практическую значимость. Подходы были следующими: моделирование нефропатий токсического генеза ядами и лекарственными препаратами с применением клинико-биохимических, токсикологических, патоморфологических, биоинформатических и статистических методов и оценок получения доказательств развития повреждения нефронов; разработка новых подходов к антидотной и детоксицирующей терапии токсических нефропатий с применением перитонеального диализа, корректора метаболического ацидоза, нефропротекторов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Применение трёхточечного кинетического исследования уровня биомаркеров тканевого полипептидного антигена, липокалина-2, молекулы-1 повреждения почки, ретинол-связывающего белка, моноцитарного хемотаксического белка-1, трансформирующего ростового фактора бета-1 в моче является перспективным подходом к диагностике токсических нефропатий.
2. Изменения акваретической функции, транстубулярного калиевого градиента, гипостенурия, протеинурия, энзимурия с высокой степенью специфичности указывают на повреждение основных функций почек, а последовательное изучение осадков мочи на наличие лейкоцитов, клеток почечного эпителия, цилиндров и гистопрепаратов почечной ткани методом световой и поляризационной микроскопии выявляет морфологический вариант токсических нефропатий.
3. Гидрокарбонат натрия, включённый в состав раствора для перитонеального диализа, обеспечивает эффективное удаление из системной циркуляции изотопа [²³⁸U] и увеличивает выживаемость крыс.
4. Диметилксобутилфосфонилдиметилат расширяет возможности стандартной антидотной терапии острого отравления этиленгликолем в токсикогенной фазе, ограничивая развитие

¹ Доказательная фитотерапия. Руководство для врачей и провизоров / Сивак К.В., Лесиовская Е.Е. – Санкт-Петербург: ООО «ФИТОТАЙМ», 2021. V том – 275 с.

выраженного метаболического ацидоза с высокой анионной разницей и осмотического некроза нефротелия проксимальных канальцев.

5. Фумарат натрия в виде 15% раствора оказывает нефропротекторное действие на моделях ишемического и нефротоксического острого повреждения почек, а растительные фитопрепараты (экстракты золотарника, репешка и череды, нефрозолид, хофитол, канефрон Н) ограничивают нефрофиброз токсического генеза.

Личный вклад автора. Автор провёл анализ литературных данных по проблеме исследования, разработал дизайн исследований и принял непосредственное участие в выполнении экспериментальных работ, провёл обработку полученных результатов и представил результаты в научных публикациях и докладах на отечественных и зарубежных конференциях.

Автором разработан способ моделирования комбинированного воздействия обеднённым ураном. Изучена динамика экскреции ряда биомаркеров с мочой в различные сроки после острого отравления с использованием трёхточечного подхода, проведена оценка чувствительности и специфичности, прогностической значимости и отношения диагностических шансов. Проведена апробация метода электрофоретического разделения ряда белков мочи крыс с острым повреждением почек, вызванным отравлением лекарственным препаратом из класса аминогликозидов на самках и самцах крыс, с последующей масс-спектрометрической идентификацией белков.

Предложен способ фармакологической защиты почечной ткани для медикаментозного предупреждения и коррекции структурно-функциональных нарушений почечной паренхимы. Диагностическая ценность маркеров была проверена в клинических условиях на базе СПб ГБУЗ «Клиническая больница Святителя Луки».

Проведено изучение эффективности натрия гидрокарбоната в составе раствора для перитонеального диализа, используемого для экспериментальной терапии острого отравления соединением урана. Исследовано влияние на выживаемость животных, показатели относительной ультрафильтрации, долю снижения уровня мочевины и перитонеального клиренса изотопа [^{238}U]. Химический анализ проводили в ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России. Проведены исследования детоксицирующих свойств диметилноксобутилфосфонилдиметилата и стандартной антидотной терапии при остром отравлении этиленгликолем. Исследована композиция экстрактов из лекарственного растительного сырья, обладающая ренопротекторными свойствами, на моделях цисплатин-индуцированной нефропатии и субхронического отравления этиленгликолем. Технология получения и стандартизация химического состава гранулята композиции экстрактов проведены на базе Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета.

Токсикологические исследования проводились в рамках темы государственного задания «Экспериментальное обоснование и разработка методических подходов к оценке риска развития последствий острого и пролонгированного низкодозового воздействия на организм обеднённого урана», НИР шифр «Уран», № г/р 1201260976 от 16.05.2012 г. в ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, протеомные и биохимические исследования проводились в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, а фармакологические исследования – в сотрудничестве с СПб ГБУЗ «Клиническая больница Святителя Луки» и Санкт-Петербургским государственным химико-фармацевтическим университетом.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов работы подтверждается проведением всех экспериментальных исследований на высоком методическом уровне. Положения, выносимые на защиту, а также выводы и практические рекомендации основаны на анализе большого массива фактического материала, представленного в таблицах, на рисунках диссертационной работы. Все полученные в ходе исследования экспериментальные данные были подвергнуты тщательному математическому преобразованию и статистическому анализу с использованием различных критериев описательной и аналитической статистики.

Основные положения диссертации были представлены в докладах на 1 зарубежной и 18 отечественных научных конференциях, в том числе с международным участием: Society of Toxicology (Charlotte, USA, 2007), III съезда фармакологов России «Фармакология – практическому здравоохранению» (Санкт-Петербург, 2007), 6-ой Международной научной конференции «Донозология-2010» (Санкт-Петербург, 2010), Юбилейной научной конференции, посвящённой 40-летию НИИГТП ФМБА России «Химическая безопасность России: медицинские и эколого-гигиенические аспекты» (Волгоград, 2011), Научной конференции Уральского федерального округа «Роль токсикологических центров в обеспечении химической безопасности на региональном уровне» (Екатеринбург, 2011), Юбилейной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития средств медицинской защиты от экстремальных факторов» (Москва, 2012), VII Международной (XVI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых учёных (Москва, 2012), IV Съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 2012), Всероссийской научной конференции молодых учёных «Медико-биологические аспекты химической безопасности» (Санкт-Петербург, 2013), РНПК «Актуальные вопросы профилактики и лабораторной диагностики в судебно-медицинской экспертизе» (Санкт-Петербург, 2013), IV Съезда токсикологов России (Москва, 2013), V-й Научно-практической конференции «Актуальные проблемы оценки безопасности лекарственных средств» (Москва, 2014), VI-й Научно-практической конференции «Актуальные проблемы оценки безопасности лекарственных средств» (Москва, 2015), Российской научной конференции с международным

участием «Медико-биологические проблемы токсикологии и радиобиологии» (Санкт-Петербург, 2015), III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» (Санкт-Петербург, 2015), II Всероссийской научной конференции «Современная лекарственная токсикология: фундаментальные и прикладные аспекты» (Томск, 2017), 7-й Международной научно-методической конференции «Фармообразование-2018» (Воронеж, 2018), Всероссийской общественной организации токсикологов (Санкт-Петербург, 2019), Междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Endourocancer meeting-2021» (Санкт-Петербург, 2021).

Экспертиза материалов диссертации прошла на заседании научно-методического совета ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России и проблемной комиссии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Внедрение результатов исследования. Разработанные новые подходы к диагностике и фармакотерапии токсических нефропатий внедрены в медицинскую и научно-исследовательскую деятельность. Полученные результаты используются в практической и научной деятельности сотрудников СПб ГБУЗ «Клиническая больница Святителя Луки» для выполнения научно-исследовательских работ, а также проведения оперативного лечения онкоурологических заболеваний (рака почки) (Акт внедрения от 05.05.2022 № 02-359/22-0-0). Для практического применения разработаны и опубликованы методические рекомендации для врачей ФМБА России МР № 12.29-15 «Оценка возможности развития последствий острого и пролонгированного воздействия ураном».

Результаты проведённых исследований внедрены в учебную работу на кафедре военной токсикологии и медицинской защиты ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ при проведении лекций и практических занятий в рамках дополнительного профессионального образования и подготовки научно-педагогических кадров по специальности «токсикология» (Акт внедрения от 27.03.2022); материалы работы используются для проведения лекционных и семинарских занятий у ординаторов, обучающихся по специальности 31.08.35 в части реализации рабочих программ по дисциплинам «инфекционные болезни», «клиническая фармакология» и «патология» в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (Акт внедрения от 01.09.2021 № 763/1).

Публикации. По материалам диссертационного исследования опубликовано 42 научные работы, из них 26 научных статей (15 статей – в журналах, рекомендованных ВАК, 6 – в отечественных биомедицинских журналах, 5 в зарубежных журналах). Получено 2 патента на изобретения РФ. Составлены и опубликованы 1 методические рекомендации. Выпущены 2 монографии.

Структура диссертации. Диссертационная работа содержит введение, основную часть, включающую обзор литературы, материалы и методы исследования, 2 главы с результатами собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Работа изложена на 282 страницах машинописного текста. Включает 40 таблиц, 63 рисунка. Список цитируемой литературы включает 619 источников, из них 79 отечественных.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. В работе приведены новые экспериментальные данные, позволяющие существенно расширить диагностические подходы к выявлению токсических нефропатий и способы их фармакотерапии. Диссертационное исследование соответствует формуле специальности 3.3.4. Токсикология (токсикокинетика, токсикодинамика, избирательная токсичность, лечение интоксикаций).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ТОКСИЧЕСКИХ НЕФРОПАТИЯХ

(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Эпидемиология и этиология нефропатий токсического генеза

Ежегодно в мире происходит около 385 миллионов случаев непреднамеренных острых отравлений ксенобиотиками, включая около 11000 летальных исходов. Основная причина смерти определяется как «заболевание или травма, вызвавшая цепь патологических событий, непосредственно приведших к смерти, или обстоятельства несчастного случая или акта насилия, вызвавшие смертельную травму» [11, 29, 47, 84]. Эпидемиология ОПП варьирует в зависимости от страны, регионов, социально-экономического статуса и эффективности деятельности учреждений здравоохранения [325]. Так, по данным Национальной системы данных о ядах (NPDS) Американской ассоциации центров по борьбе с отравлениями, из приблизительно 16,8 млн. воздействий (отравлений), зарегистрированных в NPDS, на 2016 г. было выявлено 16444 случаев отравлений отдельными веществами, токсичными к почкам, из которых 9074 случая имели серьезные осложнения, такие как ОПП, гиперазотемия и олигурия [474]. Экзогенные отравления, как заболевания от внешних причин наряду с травмами, вносят существенный вклад в структуру общей заболеваемости населения Российской Федерации [42]. Анализ динамики числа отравлений по данным статистики Росстата показал стабильное значение по стране за период с 2005 по 2017 гг. (Рисунок 1, таблица 1) [29].

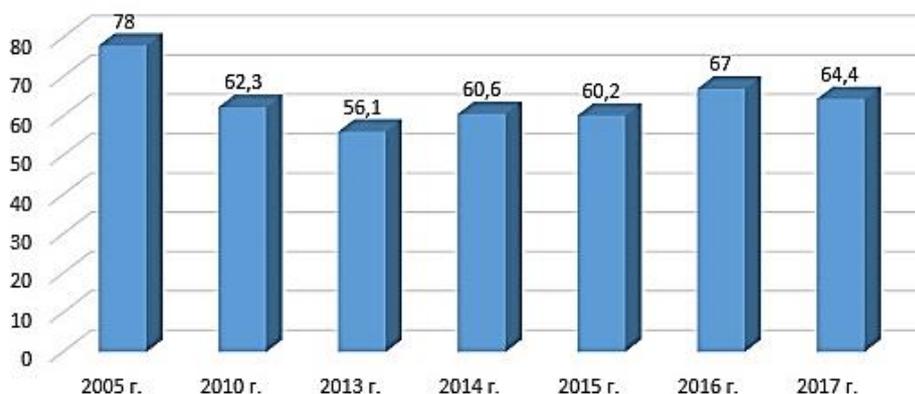


Рисунок 1 – Динамика числа отравлений (на 100 тысяч человек) в России в 2005–2017 гг.

Построено по материалам [29].

Анализ случаев отравлений в 2018 году показал увеличение доли экзогенных отравлений внутри страны на 7,14%, в том числе: в Центральном федеральном округе на 8,8% (в г. Москва на 28,8%), в Северо-Западном федеральном округе на 0,9% (в Ленинградской области – на 85,6% при снижении в г. Санкт-Петербурге на 29%), в Южном федеральном округе – увеличение на 45,8%, Сибирском федеральном округе на 14,5% [47]. Больничная летальность от острых отравлений лекарственными средствами в России колеблется от 0,5 до 6% по сравнению с таковой при отравлениях наркотиками (до 20%) [14].

Таблица 1 – Статистические материалы по числу отравлений в Российской Федерации

Субъекты Федерации	Отравления лекарственными средствами, медикаментами и биологическими веществами; токсическое действие веществ преимущественно немедицинского назначения [47]			
	абсолютные числа		на 100 000 соотв. населения	
	2017	2018	2017	2018
Российская Федерация	94513	101407	64,4	69,0
Центральный федеральный округ	18739	20420	47,7	51,9
город Москва	1559	2018	12,5	16,1
Северо-Западный федеральный округ	6132	6193	44,0	44,4
Ленинградская область	565	1053	31,3	58,1
город Санкт-Петербург	495	354	9,3	6,6
Южный федеральный округ	8313	12138	50,6	73,8
Северокавказский федеральный округ	5659	5500	57,7	56,0
Приволжский федеральный округ	22593	23165	76,4	78,4
Уральский федеральный округ	18004	18068	145,8	146,2
Сибирский федеральный округ	11161	11400	57,8	66,2

Этиология приобретённого ОПП также в значительной степени зависит от географического положения государств и наличия месторождений токсичных металлов, доступности химических веществ и заводов по их добыче и получению. Частота нефротоксического ОПП в западных странах за последние 26 лет снизилась [474].

Эволюцию этиологических причин токсических нефропатий можно отследить по данным исторических артефактов и записей. Причины острой токсической травмы почек существенно изменялись за столетия [474]. Так, в средневековой Европе применение ядов стало популярной формой убийства. Парацельс утверждал, что в мире все вещества, и лекарственные, и токсические, не отличаются друг от друга за исключением одного параметра – дозы. Наличие яда в организме пострадавшего долгие годы было очень трудно определить, поскольку симптомы отравления были сходны с признаками некоторых заболеваний, что позволяло преступникам избежать наказания [442]. С другой стороны, нефротоксичность присуща

большому классу как химических веществ, так и лекарственным средствам. Так, ганцикловир (скорректированное отношение шансов [AOR] 4,7; 95% ДИ 1,7–13,0), фуросемид (AOR 1,9; 95% ДИ 1,4–2,4) и гентамицин (AOR 1,8; 95% ДИ 1,4–2,4) значительно повышали вероятность развития ОПП у детей в критическом состоянии [532]. Классифицирование этиологического фактора в Нидерландах (2019 г.) показало, что из общей группы 783 пациентов у 62% (n=484) было установлено отравление алкоголем, у 29% (n=227) наркотиками (drugs of abuse), у 21% (n=162) фармацевтическими препаратами, в 3% всех интоксикаций – химическими веществами: пропаном (n=4), 1,2-дихлорэтаном (n=3) и толуолом (n=4). Также были зарегистрированы интоксикации бензином (парами) (n=2), анилином (n=1), сероводородом (n=1), мышьяком (n=1), метилированным этиловым спиртом (n=1), хлором (n=2), ледяной уксусной кислотой (n=1), перманганатом калия (n=1), изопропиловым спиртом (n=1) и крысиным ядом (n=1). В общей группе пациентов было 47 интоксикаций, в том числе угарным газом (n=36), а у трёх пациентов – после применения закиси азота [579].

Мониторинг этиологического фактора в России показал существенный дрейф видов и типов токсических веществ, вызывающих острые отравления, за период с 1960-х годов по настоящее время. Согласно данным И.И. Шиманко (1977) при наблюдении за 11 000 больных в период 1964–1973 гг. 36,8% отравлений развивалось с поражением почек, из них в 67,9% случаев были отмечены нефропатии различной степени тяжести и у 8,5% – развитие острой почечной недостаточности [77]. Установленными ядами, вызывающими поражение почек, были: уксусная кислота, дихлорэтан, тетрахлорметан, хлороформ, соединения тяжёлых металлов и мышьяка, этиленгликоль, щавелевая кислота, алкоголь и его суррогаты, грибы, анилин и другие метгемоглобинообразователи, сульфаниламиды, лизол, йод, ацетон, пахикарпин, змеиный яд, фреон.

В докладе ведущего уральского токсиколога В.Г. Сенцова, который выделил четыре периода-группы пациентов с острым повреждением почек токсического генеза, также детально проведён анализ этиологических причин острого поражения почек в разные периоды советского и постсоветского периода [69]. Проведённый анализ показал, что несмотря на рост общего числа больных с острыми экзогенными отравлениями отмечается отчётливая тенденция к уменьшению частоты развития острого повреждения почек в процентах с 9,7% до 2,9% при изменении этиологических факторов – в период 1973-1989 гг. уксусная кислота, этиленгликоль, метанол и соли тяжёлых металлов, в период 1990-1999 гг. структура причин почечной недостаточности несколько меняется и второе место занимает синдром позиционного сдавления, основной причиной развития которого являются отравления наркотическими средствами. Аналогичная картина отмечается и в период 2000-2006 гг: на первом месте среди

причин остаётся уксусная кислота, синдром позиционного сдавления и на третьем месте жидкости, содержащие этанол и полигексаметиленгуанидина хлорид [54, 69].

Так, по состоянию на 2008 г. Остапенко Ю.Н. и соавт. определили, что летальность достигала 17,7% при отравлении метанолом, высокий уровень наблюдался при острых отравлениях другими спиртами (9,8-12,4% – Т51.3-Т51.9). Летальность в пределах 6,7-10,7% отмечалась в группах Т52-Т53 (дихлорэтан, этиленгликоль), при этом в ряде случаев при небольшом числе пострадавших летальность достигала 100%. При отравлениях токсикантами прижигающего действия (уксусной кислотой – Т54.2), летальность составляла в 2005-2006 гг. от 11,7 до 14,6% соответственно, а в ряде стационаров доходила до 30,6% [54]. Смертельные отравления алкоголем и его суррогатами стабильно занимают лидирующее место и значительно превышают по количеству смертельных исходов интоксикации наркотическими веществами [57]. Острое повреждение почек при отравлениях уксусной кислотой, гликолями и гербицидами отличается крайне высокой летальностью, достигающей 50-60%, а при отравлении токсичными металлами – 30-40% [28].

Нефротоксины и их комбинации с лекарственными средствами являются причиной смертельных отравлений. При сочетанном отравлении несколькими лекарственными или токсическими веществами установить причину смерти, используя только данные судебно-химического исследования, невозможно, так как концентрации отдельно обнаруживаемых веществ часто находятся ниже смертельных концентраций. В случае доминирующего повреждения почек и почечного варианта танатогенеза смерть в стационаре наступает в период элиминации большинства ядов. Изучение материалов 100 случаев острых сочетанных отравлений лиц в возрасте 13-88 лет (28 женщин и 72 мужчин) с положительными данными судебно-химического исследования включал в себя проведение танатогенетического анализа, который устанавливает прямую связь отравления нефротоксичными веществами с клиническим исходом. Так, почечный вариант с некрозом канальцев был установлен в 1 случае отравления феназепамом и клозапином. Сочетанный лёгочный вариант с почечным компонентом и морфологически некротическим нефрозом был выявлен при отравлении амитриптилином, ФОС и этиленгликолем, фенobarбиталом и карбамазепином. При отравлении дихлорэтаном и этиленгликолем наблюдали мозговой танатогенез с коагулопатическим и печёночно-почечным компонентом. Экзотоксическое поражение мозга с нефротоксическим действием было установлено для смертельных отравлений этиленгликолем и амитриптилином [12]. Интоксикация колхицином вызывала тяжёлую панцитопению и смерть от полиорганной недостаточности [474]. Колхицин вызывал повреждение проксимальных канальцев с тяжёлым электролитным дисбалансом, включая гипомагниемия, гипофосфатемия и гипокальциемия [331, 474]. При острой случайной передозировке колхицином (пациент по ошибке принял

внутри 20 мг колхицина (0,22 мг/кг) на фоне приёма индометацина также описан случай ОПП [135].

Под термином «токсическая нефропатия» подразумевается развитие повреждение почек в результате химической травмы (отравления) или терапии лекарственными средствами [101, 571]. Согласно МКБ-10 последнего пересмотра [75], существуют следующие формы токсического поражения почек: N 14 – Тубулоинтерстициальные и тубулярные поражения, вызванные лекарствами и тяжёлыми металлами, включая: N 14.0 – Нефропатия, вызванная анальгетическими средствами; N 14.1 – Нефропатия, вызванная другими лекарственными средствами, медикаментами или биологически активными веществами; N 14.2 – Нефропатия, вызванная неуточнённым лекарственным средством, медикаментом и биологически активным веществом; N 14.3 – Нефропатия, вызванная тяжёлыми металлами; N 14.4 – Токсическая нефропатия, не классифицированная в других рубриках; морфологические варианты N 17 – Острая почечная недостаточность, включая: N 17.0 – Острая почечная недостаточность с тубулярным некрозом; N 17.1 – Острая почечная недостаточность с острым кортикальным некрозом; N 17.2 – Острая почечная недостаточность с медуллярным некрозом; N 17.9 – Острая почечная недостаточность неуточнённая; N 25.9 – Нарушение функции почечных канальцев уточнённое [75]. В МКБ-10 последнего пересмотра характер ятрогенной патологии отражён в трёх кодах/классах нефропатологии токсического (лекарственного) генеза (N 14.0-N 14.2) [75].

В структуре отравлений [58, 74] поражения почек очевидно возникают при отравлениях нефротоксичными веществами и следующих диагнозах: S00-T98 – Травмы, отравления и некоторые другие последствия воздействия внешних причин: T 36-T50 – Отравление лекарственными средствами, медикаментами и биологическими веществами; T 51-T 65 – Токсическое действие веществ, преимущественно немедицинского назначения, включая: T 51.8 – Других спиртов; T 52 – Токсическое действие органических растворителей; T 52.3 – Гликолей; T 52.8 – Других органических растворителей; T 53 – Токсическое действие галогенпроизводных алифатических и ароматических углеводородов; T 54 – Токсическое действие разъедающих веществ; T 56 – Токсическое действие металлов, включая: T 56.0 – Свинца и его соединений; T 56.1 – Ртуты и её соединений; T 56.2 – Хрома и его соединений; T 56.3 – Кадмия и его соединений; T 56.8 – Других металлов; T 57.0 – Мышьяка и его соединений; T 60 – Токсическое действие пестицидов, включая: T 60.3 – Гербицидов и фунгицидов; T 65 – Токсическое действие других и неуточнённых веществ, включая: T 65.3 – Нитропроизводных и аминопроизводных бензола и его гомологов [74]. При необходимости указать токсичное вещество предложено использование дополнительного кода внешних причин (класс XX).

Специфичные клинические классификации нефропатий были предложены отечественными токсикологами на основе материалов многолетнего опыта ведения пациентов

с отравлениями. Эти классификации требуют пересмотра в новом ключе времени и диагностических возможностей, но вобрали в себя, не смотря на солидный «возраст», всю широту понятия острого повреждения почек. Согласно классификации токсических нефропатий И.И. Шиманко (1977) [77] и С.Г. Мусселиуса (2002) [48] применительно к отравлениям выделяют:

- Нефропатия лёгкой степени (Шиманко) – умеренные и кратковременные изменения в моче (протеинурия, лейкоцитурия, эритроцитурия, цилиндрурия – повреждение), незначительное снижение клубочковой фильтрации и плазмотока в остром периоде заболевания с нормализацией через 1-2 недели после отравления, при этом концентрационная и азотовыделительная функции не нарушены. Нефропатия 1 степени (Мусселиус) – умеренные изменения состава мочи (биохимического и микроскопического анализа): незначительная протеинурия, микрогематурия, пиурия, цилиндрурия; содержание азотистых метаболитов и диурез остаются в пределах нормы; эффективный почечный плазмоток составляет 600-700 мл/мин.
- Нефропатия средней степени (Шиманко) – более значительные и стойкие (до 2-3 недель) изменения в моче в виде протеинурии, эритроцитурии, цилиндрурии, гемоглобинурии, присутствия клеток почечного эпителия в осадке. В раннем периоде наблюдается нарушение водновыделительной (олигурия) и концентрационной, фильтрационно-реабсорбционной функции почек и плазмотока, отмечается умеренная креатининемия без изменения уровня других азотистых метаболитов (мочевина); картина нефроза (гемоглобиновые, миоглобиновые цилиндры, гидрорический или некронефроз); нарушение функций носит обратимый, но длительный характер. Нефропатия 2 степени (Мусселиус) – проявляется олигурией и умеренной гиперазотемией (мочевина 12-18 ммоль/л, креатинин 190-410 мкмоль/л), молекулы средней массы (Габриэлян) 0,35-0,65 у.е., почечный плазмоток 270-410 мл/мин.
- Нефропатия тяжёлой степени (Шиманко) – острая почечная недостаточность с угнетением всех основных функций почек: олигоанурия, падение СКФ, гиперазотемия, снижение реабсорбции воды и снижение плазмотока. Нефропатия 3 степени (Мусселиус) – также острая почечная недостаточность, анурия, азотемия (мочевина 32-48 ммоль/л, креатинин 600-1800 мкмоль/л), молекулы средней массы 0,95-1,45 у.е., почечный плазмоток 270-410 мл/мин. На изотопных ренограммах кривые афункционального типа.

1.2 Патогенез нефропатий токсического генеза

Почки играют важнейшую роль в поддержании ионного и осмотического гомеостаза организма, выведения конечных азотистых метаболитов [16, 21, 51, 64, 66, 68]. Они выполняют волюморегулирующую, осморегулирующую, ионорегулирующую, метаболическую, инкреторную, экскреторную функции и регуляцию кислотно-основного баланса за счёт процессов: ультрафильтрации, реабсорбции, секреции и синтеза, т.е. их физиология является сложной и высокоспециализированной [9, 16, 21, 51, 66, 98, 516]. Поэтому нарушение функций почек, в том числе, вследствие воздействия нефротоксинов, может привести к жизнеугрожающему состоянию.

Острое повреждение почек – это патологическое состояние, развивающееся в результате воздействия ренальных и/или экстраренальных повреждающих факторов, продолжающееся до 7-ми суток и характеризующееся быстрым (часы-дни) развитием признаков повреждения или дисфункции почек различной степени выраженности [19, 32, 55, 325]. Термин «острое повреждение почек (ОПП)» охватывает весь спектр синдрома от незначительных изменений почечных функций до потребности в заместительной почечной терапии [321]. Клинически отравления с поражением почек проявляются ОПП ренального фенотипа. Нефротоксичность является следствием токсического действия на компоненты нефрона, в частности, нефротелий проксимальных канальцев (ПК) из-за тропности яда к почечным структурным элементам [6, 94, 426, 491]. Существуют убедительные экспериментальные доказательства того, что ОПП также ассоциируется с нарушением внутрпочечной микроциркуляции и оксигенации [506]. При этом патогенез повреждения почек при отравлениях, например, фосфорорганическими пестицидами неясен, и требует более детального изучения [84]. Нефротоксичность, вызванная лекарственными средствами, является частым и потенциально серьёзным осложнением приёма лекарств [202, 203]. Дозозависимая нефротоксичность предсказуема и связана с фармакодинамикой и кинетикой препарата. Так, AUC ванкомицина менее 650 мг×час/л была связана со снижением риска ОПП для AUC₀₋₂₄ (OR, 0,36 [95% ДИ, 0,23–0,56]), а также AUC₂₄₋₄₈ (OR, 0,45 [95% ДИ, 0,27-0,75]), т.е. была точкой отсечения cut-off [90]. Для большинства лекарств, вызывающих реакции этого типа, ОПП зависит от длительности их воздействия на почки. У других препаратов, например, аминогликозидов, токсичность связана с кумулятивным эффектом. Нефротоксичность второго типа является идиосинкразической, при этом клинические проявления могут наблюдаться в отставленный период (от недели до нескольких месяцев) [203]. Лекарственные средства и некоторые яды могут способствовать повреждению ПК без ОПП (изолированная проксимальная тубулопатия), вызывать ОПП, или сочетание ОПП и проксимальной тубулопатии. Клинически проксимальная тубулопатия проявляется

гипокалиемией, гипофосфатемией или полным синдромом Фанкони, тогда как изолированное ОПП часто осложняется гиперкалиемией и гиперфосфатемией. Проксимальная тубулопатия часто обратима, но может быть, в редких случаях, постоянной. Предрасположенность пациента к лекарственной токсичности играет важную роль при ОПП, однако неотъемлемая нефротоксичность лекарств, их транспорт и метаболизм в почках имеют решающее значение в развитии патологии [472].

Видоспецифичность нефротоксичности ряда лекарственных препаратов прослеживается в различии веществ, поражающих те или иные структуры нефронов: клубочков (например, у обезьян – блокаторов рецепторов ангиотензина 2; у крыс – блокаторов H₂ рецепторов; у собак – ампициллин), канальцев (у обезьян – НПВС; у крыс – ингибиторы АПФ, аминогликозиды; у собак – тенофовир), интерстиция (у обезьян – НПВС; у крыс и собак – цисплатин, НПВС) и сосудов почек (у обезьян – ингибиторы фосфодиэстеразы; у крыс – циклоспорин А, ингибиторы АПФ и рецепторов ангиотензина 2; у собак – агонисты глюкокортикостероидных рецепторов). Данные различия обусловлены локализацией эволюционно сформированных метаболизирующих и транспортных белков и ферментов в связи с особенностями питания и типом азотовыделения у разных видов млекопитающих, отсутствием фермента уриказы у человека, приведшим к эволюции пуринергической медиаторной системы *Homo sapiens*. Видовая специфичность поражения почек очевидно обуславливает, что одни и те же лекарственные препараты могут проявлять нефротоксическое действие при проведении доклинических токсикологических исследований у одних видов животных и не оказывать таковое у других или у человека [619].

Нефротоксины способствуют нарушению, главным образом, транспортных функций канальцев нефронов: они либо секретируются, либо фильтруются в первичную мочу, а затем, в процессе реабсорбции, концентрируются в клетках нефротелия, где оказывают своё токсическое действие на мембрану, транспортные ферменты и каналы, митохондрии, другие внутриклеточные органеллы или выпадают в осадок [23, 65, 237, 432, 433, 474, 525, 537]. Прямая нефротоксичность большинства ядов по локализации представляется как первичное повреждение сегментов ПК нефронов, расположенных в коре и переходной зоне почек. Так, дихлорид ртути вызывает нефропатию, которая при низких токсических дозах ограничивается сегментом S₃ ПК, с вовлечением сегментов S₂ и S₁ при воздействии более высоких доз. Эта специфичность обусловлена распределением ферментов и транспортных белков, участвующих в реабсорбции ртути нефротелиоцитами: апикальной гамма-глутамилтрансферазой и базолатеральной системой транспорта органических анионов ОАТ [194]. Исключением являются единичные нефротоксины, поражающие напрямую клубочки почек (пурамицин, золото, европий, иттрий, скандий), а также дистальные канальцы и собирательные трубочки

(амфотерицин Б, литий, платина), интерстициальную ткань (германий) [65, 280, 452, 552]. Экскреция редкоземельных элементов (РЗЭ) с мочой составляет <2%, так как они образуют в кровотоке коллоидные конъюгаты, которые способствуют накоплению большого количества РЗЭ в ретикулоэндотелиальной системе и клубочках почек [329]. Также существуют видовые и половые различия в действии некоторых лекарственных средств и ядов на почки (диоксид кремния, цисплатин), а прогестерон и β -эстрадиол участвуют в половом диморфизме токсичности кадмия у крыс [65, 311, 527, 587]. На рисунке 2 представлена химическая структура основных нефротоксинов. Классификация токсикантов по локализации их токсического действия на структурные компоненты почки представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Классификация нефротоксинов по месту действия в нефронах

Нефротоксины	«Точки приложения» [20, 23, 28, 55, 65, 84, 101, 105, 194, 280, 416, 443, 474, 610, 611]			
	Клубочек и сосуды	Проксимальный каналец (ПК)	Дистальный каналец (ДК)	Интерстиций
Промышленные токсиканты	Металлы: Au, Co, Eu, Hg, Sc, Y	Металлы: As, Bi, Cr, Cd, Pt (S ₃), Hg (S ₂ -S ₃), Pb, U (S ₃), Fe Этиленгликоль Паракват	Металлы: Li, V Толуол Метамидофос Паракват	Металлы: Cd, Pb, Ge Паракват Этиленгликоль Меламин
Природные токсины	Яд жёлто-зелёной куфии Яд гадюки Рассела	Орелланин Охратоксин А Цитринин Яд горбоносой гадюки	Цитринин МонокроталинЛПС	Аristoloxиевая кислота
Лекарственные средства	Доксорубицин Пуromицин Пеницилламин Циклоспорин Циклофосфамид	Ацетаминофен Аминогликозиды Гликопептиды Тетрациклины Цефалоспорины НПВС Диатризоат Циклофосфамид	Амфотерицин Ацикловир Сульфадiazин Такролимус Циклоспорин Цисплатин	Бета-лактамы антибиотики Ванкомицин Дифенин НПВС Пеметрексед Фенитоин Цисплатин

Биологические механизмы гибели клеток почечных канальцев включают в себя апоптоз, аутофагию, такие модальности регулируемого некроза как некроптоз, ферроптоз, пироптоз, и некроз [101, 111, 119, 166, 191, 256, 368, 377, 403, 483, 495]. Ванкомицин-индуцированная нефротоксичность является результатом активации клеточного окислительного стресса и апоптоза [462]. Ферроптоз, как «волна смерти», может инициировать распространение гибели клеток в корковом слое [368, 377, 403, 582]. Ранние морфологические изменения ПК обусловлены также существенным истощением восстановленного глутатиона по сравнению с металлоитионеином-1/2 [555], несоответствием между потреблением энергии и поступлением кислорода, который значительно варьируется в разных зонах почек, что увеличивает уязвимость

нефротелиоцитов к повреждению [516]. Сублетальная клеточная гипоксия и почечная паренхиматозная кислородная недостаточность, обусловленные экзогенными нефротоксинами, вызывают адаптационные реакции через факторы, индуцируемые гипоксией (HIF) [506], конечные продукты окисления [551], а окислительный стресс играет центральную роль в механизме нефротоксичности аминогликозидов [154]. Воспалительная реакция играет ключевую роль в патофизиологическом процессе повреждения и восстановления почек при ОПП. Так, в патогенезе ОПП принимают участие Толл-подобные рецепторы [574], сигнальные каскады, активируемые TGF- β [575]. Дендритные клетки, моноциты и макрофаги, нейтрофилы, Т- и В-лимфоциты способствуют повреждению почек, а нейтрофилы являются преобладающим типом клеток, которые становятся дисфункциональными при ОПП. В противоположность этому, макрофаги M₂ типа и регуляторные Т-лимфоциты необходимы для подавления воспаления, ремоделирования и восстановления после повреждения почек, а преобладание M₂ типа макрофагов обуславливает переход ОПП в нефрофиброз [129, 305]. Воспаление в почке угнетает опосредованный цитохромом P450 метаболизм эйкозаноидов, что приводит к внутрипочечной вазоконстрикции и вторичному усилению гипоксии почечных структур [101, 129, 214, 225]. При этом клетки почек с относительно низким базальным регенеративным потенциалом настолько специализированы, что их обновление требует дедифференцировки для эффективной регенерации, а регенерация единичных нефронов не обеспечивает восстановление органа в целом [98, 131, 132, 187, 206, 216]. Повреждённые канальцы отвечают на острый некроз (ОКН) посредством двух основных механизмов: полиплоидизации нефротелиоцитов и пролиферации небольшой популяции самообновляющихся клеток-предшественников, что способствует эффективной регенерации [268]. В ответ на повреждение эпителиальные клетки канальцев также могут функционировать как воспалительные и фиброгенные клетки в зависимости от цитокинового окружения. Погибшие клетки замещаются пролиферирующими клетками-предшественниками этого же отдела. Было обнаружено, что эмбриональные гипоксия-зависимые гены WT1 и Pax2, которые регулируют развитие канальцев, повторно экспрессируются во время тубулярной эпителиально-мезенхимальной трансдифференцировки при ОПП [316]. В тоже время перициты микрососудистой сети почек, как клетки-предшественники миофибробластов, участвуют в образовании фиброзных рубцов – одного из последствий ОПП [157, 324, 504]. Троекратное повреждения почечных эпителиальных клеток дифтерийным токсином с интервалом в 1 неделю приводило к патологическому восстановлению с потерей интерстициальных капилляров, фиброзом и гломерулосклерозом, что значимо коррелировало со степенью интерстициального фиброза [260]. Путь Nrf2 участвует в защитной реакции клеток уротелия при повреждении, вызванном мышьяком [586]. Сиртуин 3 защищает почки от митохондриального повреждения,

ослабляя окислительный стресс и подавляя продукцию провоспалительных цитокинов [614]. Функциональная потеря эндотелиального сиртуина 1 (SIRT1) нарушает процесс ангиогенеза в почках и вызывает активацию эндотелиальной передачи сигналов Notch1, что приводит к разрежению перитубулярных капилляров и фиброзу за счёт усиления апоптоза и старения эндотелиальных клеток с нарушением пролиферации эндотелия и увеличением популяции миофибробластов, отложением коллагена [324], что является признаком хронической болезни почек (ХБП). Таким образом, исходом острого повреждения почек могут быть как полная регенерация, так и переход в ХБП [5, 98, 132, 133, 144, 187, 206, 216, 547-549, 553, 578].

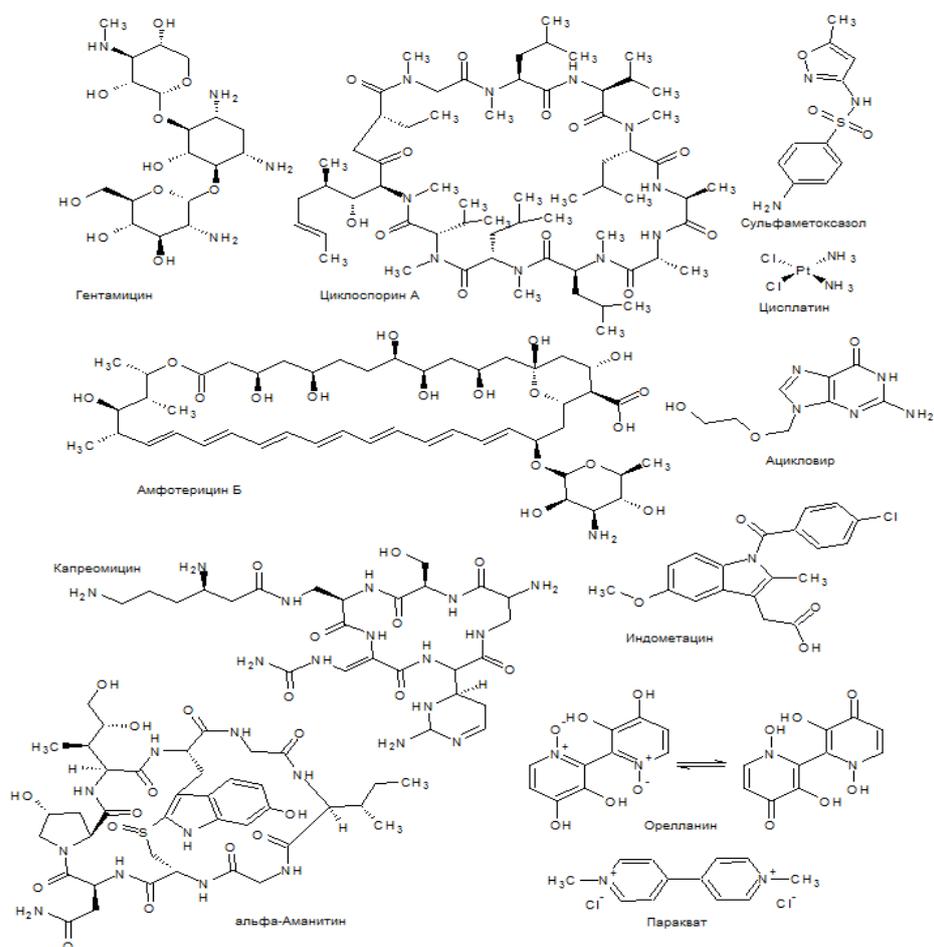


Рисунок 2 – Химическая структура нефротоксичных веществ и некоторых лекарственных препаратов, вызывающих токсическую нефропатию. Формулы построены в программе ACDLabs ChemSketch 12.

Токсичные металлы. Металлотоксикозы, как правило, сопровождаются развитием нефропатологии. Наибольшую нефротоксичность проявляют соединения ртути, кадмия, хрома, мышьяка, свинца, урана. Общим механизмом поражения почек при металлотоксикозах является

блокада тиоловых групп белков, истощение восстановленного глутатиона (ВГ) или токсическое действие комплекса металл-металлотионеин [101, 194, 276, 555, 571, 610]. Несмотря на общий механизм повреждения клеток и тканей токсичными металлами (ТМ), у каждого из них есть свои особенности в токсикодинамике и токсикокинетике данного процесса. При отравлении свинцом нарушается функция проксимальных канальцев почек, что приводит к глюкозурии, фосфатурии и аминокислотурии. Нефротоксичность кадмия проявляется в индукции апоптоза [240], при остром отравлении обусловлена развитием канальцевого некроза, оксидативного стресса [455], а при хроническом – распространённого нефросклероза и развития ХБП. Ртуть и её соединения представляют собой тиоловый яд, который ингибирует многие ферменты путём связывания и окисления сульфгидрильных групп, истощает пул ВГ, вызывая деплецию макроэргических компонентов клеток почек [456]. Нефротоксическое действие ртути проявляется в основном в S₂ и S₃-сегменте проксимальных канальцев [610]. После длительного введения дихлорида ртути крысам линии *Brown Norway* развивалась активация поликлональных В-лимфоцитов. В начале у животных вырабатывались аутоантитела к ламинину базальной мембраны, которые вызывали типичное протяжное скопление IgG вдоль базальной мембраны клубочков почек, затем вдоль базальной мембраны клубочков появлялись округлые депозиты иммунных комплексов, протеинурия и тубулоинтерстициальный нефрит [194, 341].

Передозировка препаратов железа приводит к развитию гемосидероза почек и выраженной активации оксидативного стресса [609]. Внутривенное введение препаратов железа в эксперименте на мышах вызывало индукцию профиброгенного MCP-1 (моноцитарного хемоаттрактантного белка) в почках [609]. При хронической кобальтовой интоксикации снижается активность Na⁺,K⁺-АТФ-азы почечных канальцев вследствие изменения липидного микроокружения фермента [73]. Также угнетается спонтанный диурез вследствие снижения скорости клубочковой фильтрации (СКФ). Нефротоксичность неорганических соединений мышьяка схожа с таковой для соединений ртути [524]. В экспериментах на крысах мышьякорганическая какодиловая кислота вызывала повреждение уротелия. Цитотоксические изменения в уротелиоцитах были выявлены методом сканирующей электронной микроскопии уже через 6 часов после введения токсиканта. Фокусы клеточного некроза выявлялись через 3 дня воздействия, затем сменялись широко распространённым некрозом уротелия через 7 дней после отравления. Индекс мечения бромдезоксимурином (BrdU) не увеличивался до 7 дня затравки крыс, что указывает на то, что введение какодиловой кислоты приводит к цитотоксичности с некрозом и последующей восстановительной гиперплазией уротелия [178]. Носительство токсичных металлов является установленным фактором риска развития хронической болезни почек [28, 55].

Радионуклиды (главным образом легко растворимые соединения), выделяясь из организма в основном с мочой, накапливаются и часто длительно задерживаются, вызывая морфологические изменения почечной ткани с нарушением функций почек. Поскольку при попадании в организм радионуклидов в патологический процесс первично вовлекаются не клубочки, а канальцевый эпителий и интерстиций, некоторые исследователи считают, что в начале заболевания нефрит отсутствует, а диагноз радиационное поражение почек следует рассматривать как склерозирующий нефроз различной степени тяжести [20]. У пациентов снижается относительная плотность мочи, скорость клубочковой фильтрации, клиренс мочевины и хлоридов. В моче появляются белок, лейкоциты, эритроциты и цилиндры. Химическая токсичность урана при остром отравлении, прежде всего, проявляется нарушениями функций [20, 104, 130, 230, 276, 339, 405, 453, 454, 474, 520, 538, 617] и гисто- и цитоархитектоники структурных компонентов почек [20, 113, 292, 293, 294, 328, 422, 432, 433, 512]. Уран оказывает токсическое действие на почки как тяжёлый металл и как радионуклид. Токсическая нефропатия в ранний период связана с воздействием иона уранила на эпителий канальцев. Для урана характерно развитие как ОКН, так и нефросклероза (перитубулярного и перигломерулярного) [20]. Развитие радиационного поражения почек также возможно при попадании в организм ряда других радионуклидов [20, 23, 34, 64].

Суррогаты алкоголя и органические растворители. Данные вещества редко вызывают изолированное поражение почек при отравлении. Непосредственными причинами смерти при острых отравлениях спиртосодержащими жидкостями являются тяжёлые гемодинамические нарушения, а также явления острой почечной и почечно-печёночной недостаточности, а также пневмонии в отставленный период интоксикации [13, 25, 41, 44, 54, 57, 64, 77]. Наибольший вклад в изучение токсичности гликолей внёс русский токсиколог Е.Ю. Бонитенко [13, 57]. Наиболее типичным признаком отравлений этиленгликолем (ЭГ) является двусторонний субтотальный и тотальный некроз коркового слоя почек [77]. Острые отравления суррогатами алкоголя (нефротоксичны только этиленгликоль, диэтиленгликоль, метилцеллозольв), приводят к развитию метаболического ацидоза с высокой анионной разницей и осмотического некроза нефроэпителия (диэтиленгликоль – ДЭГ) или оксалатной нефропатии и петрификации почечной паренхимы (ЭГ) [86, 529]. Высокая доза ДЭГ (10 г/кг (per os) вызывала у самцов крыс ОПП с повышением в крови креатинина и мочевины, увеличением массового коэффициента почек [357, 502, 593]. У пациентов при отравлении ЭГ и метилцеллозольвом отмечается 2-3 степень нефропатии. Большая часть поступившего в организм ЭГ подвергается биотрансформации в печени и почках под действием НАД-зависимой АДГ в гликолевый альдегид. Цитотоксичность метаболитов ЭГ распределяется следующим образом: глиоксильная кислота > гликолевый альдегид > оксалат > гликолевая кислота.

Перечисленные метаболиты ЭГ способны угнетать дыхание, окислительное фосфорилирование и синтез белка [13, 57]. При субхроническом отравлении ЭГ в малых дозах наблюдается в основном развитие оксалатной кристаллурической нефропатии с умеренным повреждением канальцев [224].

Среди прочих органических растворителей выраженной нефротоксичностью обладают 1,4-диоксан, толуол и хлоралканы [15, 44, 67, 77, 100, 411]. Хлорированные алканы вызывают жировую дистрофию нефроцитов почечных канальцев проксимальных и дистальных отделов нефрона (дихлорэтан, трихлорэтилен, гексахлорбутадиен) и гидропическую дистрофию нефроцитов (тетрахлорметан) [64, 65, 18].

Ряд **пестицидов** действует напрямую или опосредованно (высокая внутриканальцевая концентрация пестицидов, рабдомиолиз, нарушения КОС, гиповолемия из-за эксикоза), вызывая неолигурическую дисфункцию почек, канальцевый некроз и острую почечную недостаточность [12, 44, 65, 84].

Природные токсины. Среди комплексных токсинов, вызывающих ОПП, следует отметить яды змей (таблица 2), вызывающих коагулопатический вариант ОПП (жёлто-зелёная куфия, гадюка Рассела) и поражение проксимальных канальцев нефронов (горбоносая гадюка) [474]. Микромицеты синтезируют несколько нефротоксичных токсинов [398]. При отравлении ядовитыми грибами острая полиорганная недостаточность является результатом избирательного действия их токсинов на внутренние органы [117, 297]. Наиболее опасными ядовитыми грибами являются бледная поганка (поражение печени, почек и кишечника), строчки (поражение печени и нервной системы) и паутинники (поражение почек) [48].

Отравления, сопровождающиеся развитием гепаторенального синдрома, возникают при употреблении грибов, содержащих циклопептиды – аматоксины (Рисунок 2). Продуцентами аматоксинов являются следующие грибы трёх семейств: семейства *Amanitaceae* (род *Amanita*), семейства *Agaricaceae* (род *Lepiota*) и семейства *Cortinariaceae* (род *Galerina*). Аматоксины обнаружены у следующих видов рода *Amanita*: *A. phalloides* (бледная поганка), *A. virosa*, *A. verna*, *A. ocreata*, *A. bisporigera*, *A. suballiacea*, *A. tenuifolia* и *A. hygroskopica* [48].

Аматоксины, в частности альфа-аманитин из яда грибов *Amanita phalloides*, *Galerina autumnales*, *Lepiota helveola*, являются ингибиторами эукариотической РНК-полимеразы 2 типа и в случае отравления приводят к панацинарному некрозу гепатоцитов и тотальному некрозу канальцевого эпителия почек, вызывая наряду с цитолитическим гепатитом нефропатию 2-3 степени [195, 297]. Содержание мРНК в течение первых 24 ч постепенно снижается, в результате чего развивается гибель клеток-мишеней. Повреждаются, в первую очередь, эпителиальные и паренхимные клетки, обеспечивающие транспортную функцию, а основные

органы-мишени выходят из строя в таком хронологическом порядке: слизистая оболочка кишечника, гепатоциты печени и нефротелий проксимальных канальцев почек [297].

Установлено избирательное повреждающее действие α -аманитина на гепатоциты и нефротелиоциты проксимального отдела почечных канальцев, клетки желудочно-кишечного эпителия. Аматоксины преимущественно распределяются в экстрацеллюлярном пространстве. Объем распределения составляет от 160 до 290 мл/кг массы тела. Особенностью токсикокинетики аматоксинов, определяющей в значительной степени тяжесть отравления, является их способность к перераспределению [48, 297]. Аматоксины совершают энтерогепатический цикл и могут задерживаться в желудочно-кишечном тракте. Время полувыведения аматоксинов из плазмы крови составляет 36-48 часов [48, 297]. Нефропатия развивается через 73 ч после отравления аматоксин-содержащими грибами и характеризуется нарастанием азотемии, протеинурией, формированием кортикального некроза нефротелия. Поражения почек сопровождаются фульминантными гепатитами с острой печёночной недостаточностью (ОПечН) в 75% случаев [48, 297]. При выздоровлении больных поражение канальцевого аппарата может сохраняться длительное время после того как ферменты цитолиза восстанавливаются до нормы [48].

Интоксикация орелланином является одним из наиболее опасных видов отравлений грибами из-за длительного бессимптомного периода и серьёзного нефротоксического эффекта, который часто имеет необратимый характер действия [197]. Анализ более 50 случаев отравления паутинником (виды *Cortinarius spp.*) в Швеции за период с 1979 по 1999 годы представлен в работе Holmdahl J. [291]. Показано, что токсин 3,3',4,4'-тетрагидрокси-2,2'-бипиридин-N,N'-диоксид (орелланин, рис. 2), выделенный и идентифицированный ранее из паутинника плюшевого (*Cortinarius orellanus*), вызывает специфическое поражение эпителия канальцев нефрона почек [107, 331, 332]. Потребление в пищу грибов из семейства Паутинниковых (*Cortinariaceae*), рода Паутинник (*Cortinarius*) приводит к отравлению, характеризуемому токсикологами как ореллановый синдром [48].

Орелланин и гомогенаты *C. orellanus* и *C. speciosissimus* при введении животным вызывают повреждение почек и смерть через несколько дней. Орелланин имеет LD₅₀ от 10 до 20 мг/кг у мышей при внутрибрюшинном введении и LD₅₀ от 33 до 90 мг/кг у мышей при введении в желудок [48, 290, 291]. Повреждение почек сопровождается снижением скорости клубочковой фильтрации; снижением почечной реабсорбции воды, натрия и калия; протеинурией; глюкозурией; потерей щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидазы из щёточной каймы нефротелия проксимальных канальцев. Орелланин – неконкурентный ингибитор щелочной фосфатазы, но не гамма-глутамилтрансферазы [48].

Механизмом нефротоксичности орелланина и его производных является частичное окисление в семихинон с образованием комплекса семихинон орелланина-железо (III), активирующего оксидативный стресс и образование аскорбил-радикала в эпителии проксимальных канальцев почек [197]. При этом «катализатором» токсичности выступает эндогенная супероксиддисмутаза и каталаза. Спустя неделю после однократной инъекции орелланина животным патологические изменения становятся необратимыми и затрагивают синтез глутатионпероксидазы-3, щелочной фосфатазы и белка на уровне мРНК. Показано, что токсин ингибирует синтез белков, РНК и ДНК также в клеточных системах. Для орелланина и гербицида параквата (1,1'-диметил-4,4'-бипиридиний дихлорид), схожих по химической структуре (Рисунок 2), установлено, что они концентрируются в нефротелии, где метаболизируются системой цитохрома P450 в искусственную редокс-систему генерации свободных радикалов с образованием перекиси водорода, супероксидных радикалов и гидроксил-радикала, которые приводят к необратимому повреждению ткани почек. Антидотной терапии при отравлении этими ядами не разработано [48]. Поедание 15 экземпляров *S. speciosissimus* привело к острой почечной недостаточности, которая, в конечном итоге, не потребовала терапии. Тем не менее, длительная почечная недостаточность развилась даже после приёма всего двух грибов *S. orellanus*. В исследовании нефротоксичности орелланина на животных самки оказались более устойчивыми, чем самцы [48]. Исследования печёночных функций ацетилирования и гидроксילирования у отравившихся пациентов не выявили различий между теми, у кого развивалась острая почечная недостаточность, и пациентами с неповреждённой почечной функцией. Окисление орелланина в почечной ткани может приводить к накоплению хиноновых соединений, которые ковалентно связываются с биологическими структурами, что в итоге приводит к повреждению клеток. Дополнительные исследования показали генерацию орто-семихинонового анион-радикала из окисленного орелланина, что вызывало образование активных форм кислорода и истощение эндогенного глутатиона, а также аскорбиновой кислоты [145, 197, 291, 482].

Токсины, вызывающие ореллановый синдром, достаточно долго сохраняются в организме [437] и определяются через 10 дней после отравления [48]. Орелланин определяется в образцах грибов и в биосредах человека с помощью методов тонкослойной хроматографии и ВЭЖХ с электрохимическим детектором [48], масс-спектрометрии [139]. Однако данный токсин очень фоточувствителен и сорбируется на стенках стеклянной посуды, поэтому химико-токсикологический анализ при отравлении паутиниками имеет методические сложности [92, 139].

Клиническая картина отравления этими видами грибов развивается после инкубационного периода и характеризуется в основном признаками острого канальцево-

интерстициального нефрита [48, 290, 291]. Типичные симптомы, наблюдаемые через 36 часов после употребления в пищу грибов: боли в желудке, головная боль, озноб, жажда, олигурия, сменяющаяся анурией в последующие дни. Для некоторых пациентов требуется постоянное лечение с помощью гемодиализа. Частота развития острого повреждения почек при отравлении паутинниками составляет 30-50% случаев. При этом общепринято, что ореллановый синдром формируется спустя продолжительный латентный период (от 3 до 21 суток), когда манифестируются признаки глобального диффузного поражения почек, что также представляет достаточную трудность при постановке правильного диагноза – отравления грибами. И это, в большинстве случаев острого повреждения почек, обусловленного интоксикацией грибными токсинами и неэффективности поздно начатого диализа, приводит к смерти [48].

Прогностический индекс нефротоксичности CNT (Рисунок 3) для больных с установленным диагнозом отравления паутинниками (идентификация орелланина в биоптатах ткани почек) был разработан шведским профессором Й. Хольмдалем и его сотрудниками (2001) [291]. За основу были взяты данные о содержании креатинина в сыворотке крови пациентов до начала лечения (y , мкмоль/л), а также вероятное число дней после употребления грибов в пищу (x): $CNT = (y + 316)/(x \times 100)$. Индекс CNT свидетельствует о хорошем ($< 1,1$), промежуточном ($= 1,1-2,1$) или плохом ($> 2,1$) прогнозе для отравленных пациентов. Анализ данных от пациентов позволил установить большую вариабельность сроков развития поражения почек (значительные индивидуальные колебания); олигурия формировалась в среднем к 6 суткам и характеризовалась увеличением индекса нефротоксичности на 203%, а анурия – на 8 сутки и на 289%. Морфологически в биоптатах у пострадавших диагностировали наличие тубуло-интерстициального нефрита [291]. Однако, следует принять во внимание, что используемый автором индекс нефротоксичности базируется на показателе скорости клубочковой фильтрации, а не на состоянии тубулярного и интерстициального компонентов почки, которые являются главной мишенью нефротоксического действия орелланина [145].

Таким образом, диагностика и поиск способов терапии нефропатий токсического генеза вызванных отравлением грибами, представляют важную проблему современной медицины. При отравлении бледной поганкой и паутинниками в организме пострадавшего определяется большой набор токсических веществ и их метаболитов, имеющих разные физико-химические свойства, молекулярную массу и биологическую активность. Это объясняет невозможность создания универсальной детоксикационной системы для терапии таких отравлений, а знание химической структуры аматоксинов и орелланина до сих пор не позволило создать антитоды и способы эффективного лечения.

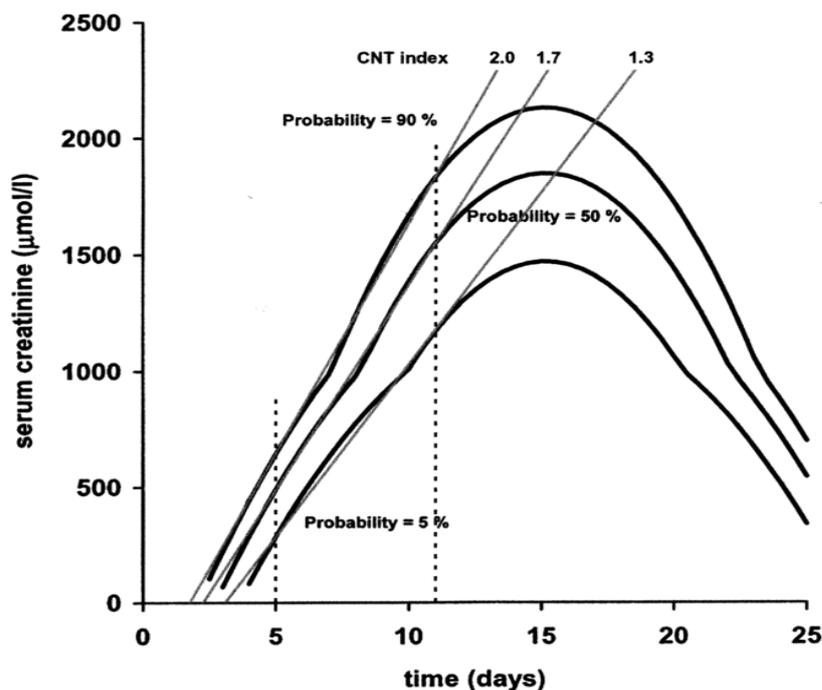


Рисунок 3 – Визуализация взаимосвязи времени от момента отравления с индексом нефротоксичности. Цитируется по [317].

Отсутствие адекватных методов диагностики в условиях скорой помощи и большинства стационаров связано как с материально-техническими трудностями (в России не производят наборов для экспресс-анализа токсинов, в большинстве лабораторий нет свидетелей-стандартов грибных токсинов), так и с сезонной приуроченностью отравлений конкретными видами грибов.

Растительный нефротоксин аристолохиевая кислота (АК, 8-метокси-6-нитрофенантро-[3,4-d][1,3]-диоксол-5-карбоновая кислота) при длительном поступлении в организм приводит к развитию дисплазии уротелия и тубулоинтерстициального нефрофиброза [99, 366], зависящего от клеточного иммунитета [116]. Механизм её действия связан с восстановлением нитрогруппы в аминогруппу и образованием аддуктов с ДНК клеток, мутациями в генах уротелиальной ткани почек, мочеточника и мочевого пузыря. Количественный анализ выявил 7-(дезоксиаденозин-N(6)-ил)-аристолактамы и 7-(дезоксигуанозин-N(2)-ил)-аристолактамы в качестве основных аддуктов ДНК-АК в различных органах крыс, более низкие уровни 7-(дезоксиаденозин-N(6)-ил)-аристолактама I и 7-(дезоксигуанозин-N(2)-ил)-аристолактама II также были обнаружены в собранных пробах мочи, при этом уровни аддукта ДНК-АК в моче отражали уровни аддукта в ткани почек [366]. Исследование экзона 2-11 белка p53 при введении аристолохиевой кислоты выявило 19 мутаций, 89% которых при секвенировании оказались связаны с парой А:Т, причём 78% из них были обусловлены трансверсией А:Т→Т:А [263].

Растения, содержащие дженколевую кислоту (метиленбисцистеин) приводят к развитию ОПП с гематурией вследствие внутрипочечной обструкции кристаллами и постренальной кристаллурической нефропатии и геморрагического цистита [142].

Лекарственные средства. При анализе причин и механизмов токсического поражения почек следует отметить, что манифестация токсического действия и побочных (нежелательных) лекарственных реакций нелинейна во времени за исключением острых смертельных отравлений. Самое большое количество нефротоксических реакций описано в научной литературе именно для лекарственных средств [232, 264, 279, 399, 435, 447, 544, 583, 597]. Идиосинкразические и обусловленные метаболитами токсические реакции не связаны с уровнем дозы препарата, чаще появляются в первые несколько недель или месяцев терапии и, в ряде случаев, обусловлены генетическим полиморфизмом, исходным иммунным статусом, наличием негативного преморбидного фона [4, 6, 23, 27, 28, 39, 53, 71, 101]. В связи с этим, наиболее корректная информация в отношении побочных эффектов лекарственной терапии имеется в данных Фармаконадзора: соотношение людей, принимавших лекарственный препарат, к числу больных с развившимися неблагоприятными реакциями из исследований «случай – контроль» [477].

При фармакотерапии заболеваний нефротоксичность лекарственных препаратов связана с преобладающей почечной экскрецией [9, 37, 56, 525]. Лекарственно-обусловленный острый тубулоинтерстициальный нефрит (ТИН) развивается при приёме многих классов лекарственных препаратов [53, 71, 72]. Ниже, в таблице 3, приведён список ЛС, вызывающих различные варианты токсической нефропатии (ТИН, обструкция канальцев, папиллярный некроз, медуллярный некроз).

Антибиотики оказывают повреждающее действие на почки по пути двух механизмов. Прямой тип повреждения (наиболее частый) является дозозависимым, с незаметным началом (симптомы не определяются на ранних стадиях), и характеризуется некрозом части клеток проксимальных канальцев почки. Патологические изменения соответствуют картине острого тубулярного некроза, что является типичным для повреждения в результате воздействия аминогликозидов и гликопептидов [56, 147, 154, 203]. Нефропатию вызывал рифампицин [174]. Нефротоксичность аминогликозидов убывает в ряду неомицин > гентамицин > канамицин > тобрамицин > стрептомицин. В токсических дозах аминогликозиды вызывают нарушение проницаемости мембран митохондрий и лизосом нефротелиоцитов, накопление ламеллярных включений внутри лизосом (фосфолипиды), а затем, по механизму активации оксидативного стресса и липопероксидации, разрушение клеток. Гентамицин приводит к потере целостности границы клеток, апоптозу и некрозу проксимальных канальцевых клеток. Накопление гентамицина в клетках проксимальных канальцев опосредовано эндоцитарным комплексом

апикальной мембраны, включающим белки мегалин и кубилин. Этот эндоцитарный рецепторный комплекс транспортирует катионные молекулы, присутствующие в канальцевом ультрафильтрате, в клетки. Попав внутрь клеток (через катионные каналы), гентамицин изменяет функцию различных органелл. В дополнение к своим токсическим эффектам гентамицин способен активировать чувствительный к кальцию рецептор (CaSR), присутствующий в апикальной мембране проксимальных канальцевых клеток, что приводит к гибели клеток канальцев. Агонисты CaSR, такие как гадолиний и гентамицин, активируют фосфолипазу C в проксимальных канальцевых клетках, что приводит к образованию инозитол-1,4,5-трифосфата и, как следствие, к высвобождению кальция из внутриклеточных запасов. Индуцированное гентамицином увеличение ионизированного кальция было значительно выше по сравнению с таковым, вызванным агонистом CaSR, гадолинием, а цитотоксичность может развиваться при воздействии очень низких доз антибиотика. Авторами было показано, что доза 100 мкМ гентамицина изменяет метаболизм и морфологию клеток MDCK-C11 [186]. Митомицин C повреждает уротелиальные клетки [265].

Таблица 3 – Перечень ЛС, вызывающих токсические нефропатии [187, 272, 390, 443, 477, 493]

Наименование ЛС	Первичный механизм поражения почек
Ацетаминофен	аллергический ТИН, ОКН
Ацикловир	обструктивная нефропатия
Ампициллин-сульбактам	аллергический ТИН, обструктивная нефропатия
Бацитрацин	острый некроз канальцев
Карбамазепин	аллергический ТИН
Кеторолак	папиллярный и медуллярный некроз
Холекальциферол	обструктивная нефропатия
Ципрофлоксацин	аллергический ТИН, обструктивная нефропатия
Циклоспорин А	хронический ТИН, вазоконстрикция
Фуросемид	аллергический ТИН
Гентамицин	острый некроз канальцев
Омепразол	аллергический ТИН
Фенитоин	аллергический ТИН
Рифампицин	аллергический ТИН
Сульфаметоксазол-триметоприм	ТИН, обструктивная нефропатия
Варфарин	холестериновая эмболия микрокапилляров

Примечание: ТИН – тубулоинтерстициальный нефрит, ОКН – острый канальцевый некроз

Ванкомицин представляет собой трициклический гликопептидный антибиотик, который образует комплекс с ацил-аланин-аланином мукопептида клеточной стенки бактерий, ингибирует её формирование и повышает проницаемость, нарушает синтез РНК. Нефротоксичность (вплоть до развития почечной недостаточности) при приёме ванкомицина

проявляется повышением концентрации креатинина и мочевины в крови; редко развитием интерстициального нефрита [112, 203]. Механизм нефротоксичности ванкомицина связан с энергозатратами на канальцевый транспорт гликопептидов из крови в клетки канальцев и реабсорбцию [90, 112]. В опытах на крысах введение ванкомицина в дозе 200 мг/кг приводило к снижению активности гамма-глутамилтрансферазы в моче на 60% по сравнению с контрольной группой крыс, при этом отмечали повышение активности лактатдегидрогеназной активности мочи в 8 раз и увеличение массового коэффициента почек в 2,5 раза. Уровень мочевины в крови увеличивался в 4, а креатинина – в 5 раз. Патологические изменения в почках крыс характеризовались интерстициальным и перипеллюлярным отёком, некрозом и атрофией нефроэпителия канальцев с гиалиновыми и лейкоцитарными цилиндрами в их просвете. Экспериментальные исследования подтвердили провоспалительное действие, митохондриальную дисфункцию и апоптоз как основные механизмы развития нефротоксичности ванкомицина [90, 112]. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к CD10⁺ и одноцепочечной ДНК выявило повреждение проксимальных канальцев почек с заметной дилатацией, а также многочисленные клетки в состоянии апоптотической гибели [546].

Полимиксин Б поражает клетки проксимальных канальцев почек [203, 573]. Нефротоксичность полимиксина Б выражалась в уменьшении клиренса креатинина и увеличении почечного сосудистого сопротивления, а также окислительного повреждения *in vivo*. Крысы самцы линии *Wistar* с массой тела 286±12 г получали 4 мг/кг/день полимиксина Б внутривентриально один раз в день в течение 5 дней. Клиренс креатинина рассчитывали по следующей формуле: клиренс креатинина = [концентрация креатинина в моче (мг/дл) × 24-часовой объем мочи (мл/мин)]/концентрация креатинина в сыворотке (мг/дл). Рассчитанная скорость клиренса креатинина (мл / мин) была нормализована к массе тела крыс. Повреждение митохондрий было подтверждено электронной микроскопией и цитозольной локализацией цитохрома с. Гистологический анализ выявил у животных, получавших полимиксин Б, наличие тубулоинтерстициального повреждения с отёком и диффузной инфильтрацией интерстиция, атрофией нефротелия, некрозом канальцев в корковом веществе почек. Авторы продемонстрировали, что присутствие возрастающих концентраций полимиксина Б (12,5, 75 и 375 мкМ) в клетках LLC-PK1 приводит к снижению их жизнеспособности и увеличению со временем числа клеток, погибших по пути апоптоза, демонстрируя зависящую от концентрации и времени цитотоксичность полимиксина Б. Снижение жизнеспособности клеток и увеличение апоптоза, уровней лактатдегидрогеназы и оксида азота подтвердили цитотоксичность полимиксина Б [573].

Антимикотический полиеновый препарат амфотерицин Б обладает отличающимся механизмом нефротоксичности [203]. При исследовании токсичности было установлено, что амфотерицин Б угнетает протонный градиент в клетках дистальных канальцев, связующих и собирательных трубок в большей степени во внутреннем и внешнем мозговом слое почек, но не в корковом веществе почки, а также активирует Толл-подобные рецепторы 4 типа TLR4, подобно бактериальному липополисахариду. Нефротоксичность амфотерицина клинически проявляется нарушением гомеостаза калия – увеличением трансбубулярного калиевого градиента, потерей с мочой калия, магния и развитием почечного канальцевого ацидоза 1 типа [274, 313, 318, 406, 407].

Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС). Около 5% пациентов, принимающих НПВС, по клиническим данным могут иметь ренальные побочные эффекты в форме острой и хронической нефропатии [4, 6, 27, 28, 37, 39, 53, 55, 390]. Различные формы ОПП, вызванные НПВС, включали почечный папиллярный некроз, острый интерстициальный нефрит, гиперкалиемию и задержку жидкости. Острая форма этих побочных эффектов зависит от дозы и продолжительности курса лечения НПВС и обычно обратима. НПВС со свойствами кислот (ацетилсалициловая кислота, нитросалициловая кислота, диклофенак, ибупрофен, индометацин, напроксен, пироксикам и прочие) могут ингибировать митохондриальное окислительное фосфорилирование. В тоже время НПВС, которые не имеют карбоксильной группы (димерофлурбипрофен, нитробутилфлурбипрофен) и селективные ингибиторы ЦОГ-2 практически не влияют на процессы тканевого дыхания и фосфорилирования и имеют значительно меньший нефротоксический потенциал. Диклофенак и мефенамовая кислота являются мощными индукторами выхода кальция из митохондрий коры почек. В процессе биотрансформации в почках первично нетоксичные НПВС превращаются в активные гидроксильные метаболиты, которые ковалентно связываются с макромолекулами, изменяют их функцию, приводя к некрозу клеток. При участии цитохрома P-450 изофермента CYP2E1 из парацетамола образуется N-ацетил-пара-бензохинонимин, который нарушает митохондриальную и ядерную функции, вызывает быстрое истощение НАДН и НАДФН, блокируя митохондриальную энергетику [390]. В результате снижается функция ионных насосов и кальций выходит в цитозоль. Индометацин *in vivo* усиливает действие ангиотензина-2 на почки, вызывает снижение скорости почечного плазматока и клубочковой фильтрации. Эксперименты показали, что для селективных ингибиторов ЦОГ-2 также характерна нефротоксичность, связанная, вероятно, с ингибированием в почках обоих изоферментов циклооксигеназы. Острая олигурическая почечная недостаточность при приёме НПВС ассоциируется с внутрпочечной вазоконстрикцией из-за блокады синтеза простагландинов [4, 8, 53, 65, 78, 390].

Взаимодействие НПВС с другими лекарствами. Назначение селективных и неселективных НПВС следует избегать у пациентов с хроническими заболеваниями почек, хронической сердечной недостаточностью или декомпенсированным циррозом печени. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ), блокаторы рецептора ангиотензина-2 (БРА) и β -блокаторы, также могут увеличивать риск нефротоксичности НПВС. При гипертонической болезни у пациентов с нарушенной функцией почек, которые получали лечение с использованием АПФ-ингибиторов или БРА, НПВС также могут дополнительно уменьшать как эффективность антигипертензивных средств, так и гломерулярную перфузию и способствовать развитию почечной недостаточности ишемического типа [4, 14, 39, 53].

Химиотерапевтические противоопухолевые средства. Синтетический антифолат для лечения непрогрессирующего неплоскоклеточного рака лёгких пеметрексед, наряду с тубулопатией, вызывал в некоторых случаях у пациентов развитие интерстициального нефрита с фиброзом [105]. Точками приложения нефротоксического действия циклофосфида являются сосуды, капилляры клубочков и проксимальные канальцы почки [474]. Токсическую нефропатию с поражением канальцев и клубочков нефронов вызывает доксорубин [193, 215].

Цисплатин является мощным противоопухолевым алкилирующим цитостатиком – он бифункционально алкилирует нити ДНК, подавляет биосинтез нуклеиновых кислот, вызывает гибель клеток, а также имеет ряд нежелательных реакций, в том числе выраженную нефротоксичность (в 28-36% случаев) [56, 65, 201]. В механизме нефротоксичности цисплатина лежат два процесса: при однократном введении массивной дозы прямое проапоптотическое и тубулотоксическое действие на проксимальные и дистальные канальцы и развитие отдалённого тубулинтерстициального нефрофиброза при длительном курсовом введении терапевтических и субтоксических доз [217]. При хроническом введении у крыс цисплатин индуцирует азотемическую форму токсической нефропатии [167, 237].

Новые лекарственные средства – антисмысловые олигонуклеотиды [210] и ингибиторы контрольных точек иммунного ответа [184] вызывают различные варианты токсических нефропатий.

Циклоспорин А применяется при пересадке почки, печени, сердца, лёгкого, поджелудочной железы (профилактика отторжения трансплантата, лечение реакции отторжения), костного мозга. Введение циклоспорина (CsA, OL 27400) в фармакотерапию трансплантации органов привело к существенному улучшению результатов ранней трансплантации. Однако в отдалённом периоде отмечали развитие хронической трансплантационной нефропатии. Циклоспорин, а также другой ингибитор кальцинейрина, такролимус, может вызывать как острую, так и хроническую нефротоксичность с понижением

функций трансплантированной почки наряду с артериолопатией и интерстициальным фиброзом [214].

Противовирусные средства. Противовирусные средства для терапии вирусного гепатита В вызывают митохондриальную дисфункцию и ОПП у лабораторных животных [565]. Ацикловир (синтетический аналог пуриновых нуклеозидов) после поступления в инфицированные клетки, содержащие вирусную тимидинкиназу, фосфорилируется и превращается в ацикловир монофосфат, который под влиянием клеточной гуанилаткиназы преобразуется в дифосфат, и затем под действием нескольких клеточных ферментов – в трифосфат. Ацикловира трифосфат взаимодействует с вирусной ДНК-полимеразой, включается в цепочку вирусной ДНК, вызывает обрыв цепи и блокирует дальнейшую репликацию вирусной ДНК. Со стороны мочеполовой системы при внутривенном введении вызывает транзиторное повышение уровня азота мочевины и креатинина в крови; острую почечную недостаточность при быстрой инъекции. Нефротоксичность ацикловира была установлена в 13% случаев применения у 268 пациентов (случаи острого повреждения почек, ОПП). При однофакторном анализе ОПП чаще встречалось у пациентов с ранее существовавшим хроническим заболеванием почек (ХБП), диабетом и у пациентов, получавших более высокие суточные дозы ацикловира. У людей пожилого возраста в биномиальной модели логистической регрессии только ХБП и суточная доза оставались значимыми независимыми факторами риска нефротоксичности ацикловира [159]. Ацикловир и его аналог индинавир в высокой концентрации выделяются с мочой и могут быть причиной кристаллурической интра- и постренальной нефропатии из-за обструкции мочевых путей кристаллами [202, 203], что также характерно для терапии высокими дозами витаминов, сульфаниламидов и сульфаниламидов в комбинациях, отравлениях промышленными химическими токсинами.

Кристаллурическая нефропатия. Тубуло-обструктивный эффект [203], вызванный осаждением лекарственного средства или его метаболита в моче и впервые наблюдавшийся после лечения сульфаниламидами в 1940-х годах, является проблемой при назначении высоких доз сульфаниламидов пациентам с ослабленным иммунитетом (сульфадиазин, ко-тримоксазол) [443, 618]. Развитие кристаллурии зависит от концентрации и растворимости отдельных препаратов и их метаболитов в моче, и чаще встречается после парентерального, чем перорального введения. Сульфаметоксазол (SMX) и структурно родственные сульфадоксин, сульфациназол, компонент сульфасалазина и дапсон представляют собой сульфониламинамины. Они характеризуются сульфонамидным фрагментом, непосредственно связанным с бензольным кольцом, и незамещённым амином (-NH₂) в пара-положении (Рисунок 2). Механизм реакций гиперчувствительности на сульфониламинамины включает IgE, иногда IgG типы реакций, опосредованные Т-клетками [511]. Сульфаметоксазол является пролекарством: он

метаболизируется в печени цитохромом P450 изоферментом CYP2C9 [37] до сульфаметоксазол-оксима SMX-NHOH, который далее окисляется до сульфаметоксазол-N-оксида SMX-NO. SMX-NO обладает высокой реактивностью, связываясь с цистеинами в растворимых и клеточно-связанных белках. Таким образом, он может вызывать опосредованный IgE и/или T-клеточный ответ на модифицированные белки, что может приводить к различным клиническим проявлениям. Что ещё более важно, сульфаметоксазол способен напрямую связываться с иммунными рецепторами. Это типичный пример концепции фармакологического взаимодействия с иммунными рецепторами, а именно, что лекарственное средство может напрямую связываться с HLA (пи HLA) и/или T-клеточными рецепторами TCR (пи TCR) и, таким образом, косвенно или напрямую вызывать стимуляцию T-клеток. У пациентов с аллергией на сульфонилариламин при приёме препаратов иммунные реакции могут быть направлены на структурный компонент почек за счёт перекрёстной реакции с другими сульфонилариламинами, но не сульфонидами в целом. Лабораторный анализ T-клеточных реакций и клинические данные показывают, что несульфонилариламиновые препараты, такие как глибенкламид (глибурид), фуросемид и цецекоксиб, не стимулируют иммунный ответ у пациентов, страдающих аллергией на сульфонилариламиды [511].

Токсическое действие меламина связано с особенностями его метаболизма. В почках откладывается ко-кристаллизующийся комплекс меламина и его метаболита циануровой, а также мочевой кислот [200, 534]. Механизм почечной недостаточности у животных, которым вводили кристаллы меламина-цианурата, считается подобным острой уратной нефропатии у человека. Меламиновая нефропатия представляет собой постренальную кристаллурическую форму повреждения почек с тубулярным некрозом и кистозным расширением в кортико-медуллярной S-зоне в результате обструкции мочевыводящих путей «сферически симметричными, излучающими кристаллическими агрегатами», которые были обнаружены как в просвете клубочков, так и в интерстиции почек крыс методами FTIR и Рамановской спектроскопии [168, 169]. Следует отметить, что кристаллы при уратной нефропатии, как и состоящие из меламина-цианурата, не выявляются при ультрасонографическом исследовании почек. Это микроскопические изменения. У животных и людей камни состоят, в основном, из мочевой кислоты и меламина. Поскольку структура меламина позволяет связывать водород с мочевой кислотой, совместное осаждение не является неожиданным. В случае крыс это соотношение равно 1:1, тогда как у людей оно ближе к 2:1. Важной находкой исследователей стало обнаружение того, что через 24 часа фиксации почек крыс в нейтральном забуференном растворе формалина все кристаллы растворяются бесследно и на их месте остаются кистозоподобные пустоты [169].

Лекарственно-индуцированный острый тубулоинтерстициальный нефрит (ОТИН)

возникает при назначении препаратов из различных классов [28, 39, 65, 101, 321, 439, 443, 467, 477, 493, 511]. Возможность развития острой тубулоинтерстициальной лекарственной патологии почек определяется индивидуальной чувствительностью и генетическим полиморфизмом метаболизирующих систем организма, не зависит от дозы препарата, но связана с длительным поступлением и антигенным стимулированием иммунной системы [39, 511]. При ОТИН в патогенезе преобладают токсико-аллергические и иммунологические реакции.

При **хроническом тубулоинтерстициальном нефрофиброзе (ХТИФ)** основой прогрессирования инвалидизирующей патологии является фиброзное разрастание соединительной ткани в интерстициальном пространстве и сморщивание почек (Рисунок 4). Это происходит как следствие перенесённого ОПП и при длительном поступлении в организм нефротоксичных веществ, лекарственных препаратов за счёт их прямого токсического действия. В результате ишемии тубулярного эпителия проксимального сегмента канальцев, клетки секретируют хемокины и факторы роста, которые способствуют миграции в интерстиций моноцитов. Далее, моноциты и макрофаги, участвуют в секреции профиброгенных факторов роста, что инициирует пролиферацию покоящихся в интерстиции фибробластов, а также тубулярного эпителия. Тубулярные эпителиальные клетки подвергаются эпителиально-мезенхимальной трансдифференциации (ЭМТ 2 типа), в результате которой они начинают экспрессировать мезенхимальные маркеры, то есть, изменяют свой фенотип. Активация интегринами и гипоксией фибробластов приводит к гиперпродукции альфа-гладкомышечного актина (α -SMA) и белков экстрацеллюлярного матрикса, усилению экспрессии ингибиторов протеиназ. Накопление компонентов соединительной ткани происходит в две фазы: воспалительный синтез (в момент притока моноцитов) и поствоспалительный синтез матрикса. Последний играет ведущую роль в деструкции физиологической микроструктуры самой почки [503]. Токсический тубулоинтерстициальный нефрит у пациентов характеризуется канальцевыми повреждениями, интерстициальным воспалением и фиброзом. Анализ линейных корреляционных характеристических кривых показал связь уровня моноцитарного хемотаксического белка (MCP-1) в моче со степенью интерстициального отёка и воспалительной инфильтрации ($r = 0,501$, $p < 0,001$ и $r = 0,768$, $p < 0,001$, соответственно), тогда как патологические уровни липокалина-2 (NGAL) в моче имели наивысший коэффициент корреляции с канальцевой атрофией ($r = 0,692$, $p < 0,001$) [598].

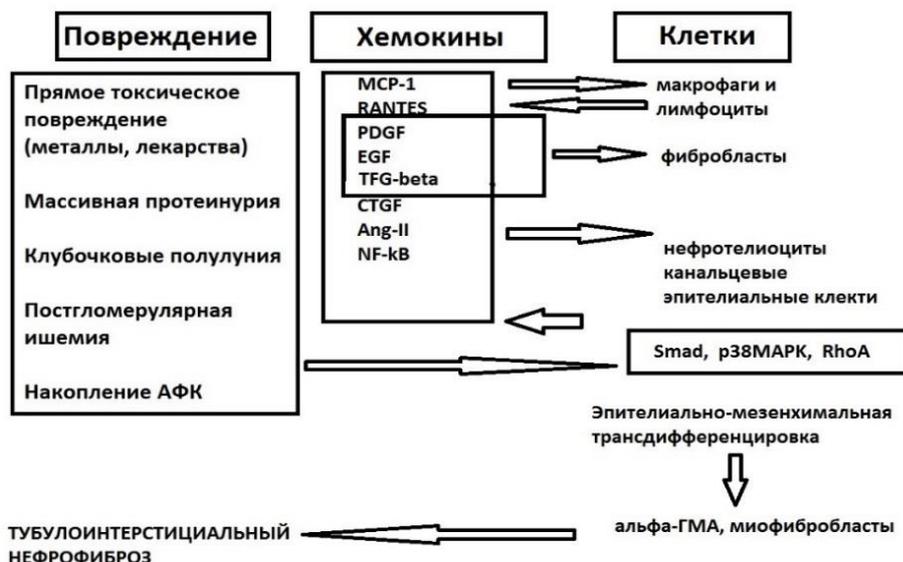


Рисунок 4 – Механизм развития тубулоинтерстициального нефрофиброза.

Адаптировано по материалам [503].

1.3 Современные методы изучения нефротоксичности

В современной медицине лучевые методы имеют важное значение, и для них характерна возможность исследования почек без нарушения целостности покровов организма, то есть не инвазивно. В клинической практике широкое применение имеют визуализирующие физико-химические, радиоизотопные, реносцинтиграфические и ультразвукографические методы исследования почек и системы оценки тяжести состояния [28, 32, 33, 38, 62, 63, 71, 79, 102, 226, 451, 596], применяемые и в экспериментальной токсикологии [417, 431, 565]. Наиболее распространённый метод – ультразвуковое исследование почек, он может применяться в динамическом наблюдении, однако не способен выявлять изменения в ранней фазе острого повреждения почек. Для оценки кровоснабжения и функционального состояния почек широко используют радионуклидные (радиоизотопные) исследования [596]. Данная группа методов входит в перечень диагностических процедур в клинических рекомендациях по острому повреждению почек и тубулоинтерстициальным болезням почек [32, 33].

Экспериментальная токсикология обладает инструментами для исследования генетических, молекулярных, биохимических, клеточных и органных механизмов патогенеза нефропатий, недостижимыми в клинической практике [9, 10, 65, 93, 101, 213, 219, 227, 416]. Методы экспериментального изучения нефротоксичности включают в себя клиренсовые методы, мочевые маркеры, гистологические и иммуногистохимические методы, изолированную перфузируемую почку, микропункцию и микроперфузию, микродиссекцию

сегментов нефронов [416], высокопроизводительный скрининг [496], иммортализованные клеточные линии почечного эпителия [126] и клеток почек человека [508], дифференциальную экспрессию генов [147], получение линий клеток-предшественников нефронов (NPC) из эмбриональных почек мыши в формате 3D-культуры, а также редактирование генов [225, 369, 370, 610], модели почки [326], биочипа человеческой почки kidney-on-a-chip [590]. В экспериментальной токсикологии также используют математическое моделирование [241], биомиметические микроустройства, имитирующие сложную динамическую среду нефрона [491].

Исследование нефротоксичности с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) [490] продемонстрировало, что меченные фтором-18 молекулы 2-трет-бутил-4-хлор-5-[6-(4-[(18F)фторбутоксипиридин-3-илметокси]-2H-пиридазин-3-он)]-18F-BCPP-BF обладают потенциалом в качестве ПЭТ-зонда для количественной визуализации печёночной и почечной дисфункции вследствие нарушения активности митохондриального комплекса I (MC-I) на ранней стадии передозировки ацетаминофена (внутрибрюшинно в дозе 100 и 300 мг/кг) [451]. Передозировка ацетаминофена вызывает острый гепатотоксический и нефротоксический эффекты с массивным центрлобулярным некрозом печени и острой почечной недостаточностью. Однако молекулярный механизм нефротоксичности ацетаминофена отличается от такового гепатотоксичности, поскольку N-ацетилцистеин защищает от гепатотоксичности, но не нефротоксичности парацетамола. Одним из наиболее интересных результатов исследования было то, что острые побочные эффекты ацетаминофена на печень и почку были обнаружены при снижении поглощения ^{18}F -BCPP-BF уже через 2 ч после введения ацетаминофена, в то время как обычные биохимические параметры в плазме и моче, обычно используемые в медицинских условиях, начали изменяться через 6 ч или позже при более высокой дозе. Было выявлено сильное поглощение ^{18}F -BCPP-BF почкой, особенно корковым слоем, и более слабое поглощение мозговым слоем. Это более сильное поглощение может быть объяснено несоответствием кровотока между корой и лоханкой в почке – кортикальный кровоток в пять раз превышает кровоток в области почечного сосочка в противоположность «шоковой» почке [451].

Высокая степень биохимической гомологии по данным иммуногистохимии S₁-S₃ сегментов ПК у человека и крыс делает этот вид млекопитающих наиболее релевантным для выявления нефротоксичности [93, 225, 416]. Экспериментальные модели на клетках почечного эпителия [126, 134, 417] и нефропатий при отравлении различными веществами и лекарственными препаратами у животных изучены с применением методов оценки на момент опубликования и обобщены в ряде современных научных статей [227, 288, 292-294, 408, 416, 462, 530]. Нефротоксическое ОПП вызывали гентамицином, цисплатином, диатризоатом,

ацетоаминофеном, уранила нитратом, дихлоридом ртути, калия бихроматом, фолиевой кислотой, паракватом и другими веществами. При моделировании нефротоксичности также применяли дигликолевую кислоту [502], комбинацию трандолаприла с ибупрофеном и фуросемидом [485]. Однако не все работы детально дифференцировали фенотип создаваемого ОПП или же он включал в себя также преренальную форму поражения почек [227, 285].

Изучение результатов общего анализа мочи даёт наводящую информацию о состоянии верхних мочевых путей [24, 498, 541]. Моча используется для мониторинга экспозиции к токсичным металлам (мышьяку, кадмию, ртути, свинцу) [10, 11, 64, 65], а также этиленгликолю [15, 67, 513]. Атомно-абсорбционная и масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (ICP-AES и ICP-MS) являются наиболее подходящими методами для определения следовых количеств токсичных металлов и радионуклидов в моче и крови [211, 329, 405]. Разработан и апробирован метод одновременного количественного определения общего содержания урана и соотношения урана $^{235/238}\text{U}$ – изотопное соотношение U в моче с помощью масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS). Было установлено, что все рабочие характеристики анализа соответствуют клиническим лабораторным стандартам. Анализ был линейным в диапазоне концентраций от 1,0 до 500,0 нг/л урана. Метод был точным с пределами обнаружения 2,5 нг/л для общего урана и 9,8 нг/л для изотопного соотношения. Точность составила больше 93%, а коэффициент вариации (CV%) был менее 5,0% как для общего урана, так и для изотопного соотношения [577]. Для анализа органических соединений высокую чувствительность и точность продемонстрировали аналитические методы на основе измерения массы/заряда ионов – жидкостная хроматография с масс-спектрометрией и времяпролетная масс-спектрометрия (HPLC-MS/MS и HPLC-TOF-MS). Биомаркерами экспозиции также являются аддукты с нуклеиновыми кислотами и белками, посттрансляционные неферментативные модификации белков.

Биомаркеры эффекта отражают количественные изменения биохимических, физиологических или других параметров организма, которые происходят в результате экспозиции или отравления [10, 95, 104, 109, 136, 182, 192, 239, 242, 243, 244, 273, 300, 301, 308, 344, 348]. В теоретическом плане идеальный биомаркер должен отражать ранние обратимые изменения в тканях, органах-мишенях или организме. Метод иммуноферментного анализа (ИФА или ELISA) наиболее часто используется для измерения уровня биомаркеров. Для ряда белков мочи используют метод лазерной нефелометрии [514]. К биомаркерам чувствительности относится полиморфизм генов метаболических путей. В процессе отбора биомаркеров, наряду с чувствительностью и специфичностью, важное значение имеют практические вопросы, в том числе, финансовые затраты [10, 11, 65]. Так, измерение анионной разницы используется для подтверждения отравлений метанолом и этиленгликолем [560].

Сотрудниками Института токсикологии Швейцарского федерального технологического института (Шверценбах) была представлена концепция скринингового теста на нефротоксичность, основанного на количественной оценке мочи, собранной в стандартных условиях в течение 15,5 часов [612]. У интактных самок крыс *Sprague-Dawley* было выполнено от одного до восьми сборов мочи. Были определены нормальные значения потребления воды, объема мочи, pH и экскреции белка, гамма-глутамилтрансферазы, малатдегидрогеназы, электролитов, глюкозы, аминокислот, лейкоцитов, эритроцитов, эпителия, неутонченных клеток и цилиндров. Критерии испытаний были установлены на основе статистического распределения этих измерений. У крыс, многократно помещаемых в метаболические клетки, наблюдали статистически значимое снижение экскреции лейкоцитов и увеличение экскреции эпителия и неутонченных клеток. Все остальные переменные со временем не изменились. Подтверждение этого неинвазивного скринингового теста для обнаружения повреждения почек основано на повторяющемся количественном анализе мочи в группах из шести самок крыс *Sprague-Dawley*, получавших 5 дней подряд низкие дозы тестируемых веществ. В последующие недели вводили более высокие дозы до тех пор, пока не наблюдались нефротоксические эффекты или признаки общей токсичности. Использовали тринадцать эталонных нефротоксических веществ (гексахлор-1:3-бутадиен, цисплатин, карбоплатин, сурамин, хлороформ, неомицин, рифампицин, фенацетин, фенилбутазон, метициллин, оксалат натрия, этиленгликоль и фуросемид). Определяли процент крыс, достигших критериев теста, т.е. патологических значений, определенных на основе измеренных контрольных значений. В группе контроля общий процент крыс, достигших или превышающих критерии теста, составил 4,48%, что близко к ожидаемым 5%. Доказательства нефротоксичности были обнаружены для всех нефротоксических веществ. Повышенное выделение клеток и появление цилиндров были наиболее чувствительными индикаторами поражения почек. Гематурия была наиболее частой находкой. Из других измеренных компонентов мочи чаще была повышена активность фермента малатдегидрогеназы (МДГ). Время от времени менялись потребление воды, объем мочи, pH и удельный вес, а белок, глюкоза, электролиты, аминокислоты и гамма-глутамилтрансфераза (ГТФ) менялись редко [219, 612].

Научные исследования показали, что для получения репрезентативных данных необходим сбор 24-часовой мочи у крыс [80, 346]. К мочевым биомаркерам относят ряд ферментов нефротелия различных зон и участков нефронов – аланинаминопептидаза (АлАП) [93, 289, 492], лейцинаминопептидаза (ЛАП), щелочная фосфатаза (ЩФ) [509], гамма-глутамилтрансфераза (ГТФ) [189, 333-335, 509], N-ацетил-глюкозаминидаза (НАГ) [93, 171, 509, 564], катепсин В, лизоцим, лактатдегидрогеназа (ЛДГ), гексокиназа (ГК) [93, 610], комбинация ГТФ и ЛДГ [481], а также низкомолекулярные белки бета-2-микроглобулин (β 2-МГ), альфа-1-

микроглобулин, ретинол-связывающий белок (RBP) и другие [93, 416]. Измерение активности ферментов мочи представляется весьма простым и доступным лабораторным методом [189, 190, 194, 205, 381, 430, 436, 610].

Технологии «омики» сейчас считаются важной методологической частью системной или интегративной биологии, с помощью которой можно наблюдать глобальные изменения транскриптов (геномика), белков (протеомика) или метаболитов (метабономика) в клеточных системах или тканях [110, 147, 229, 251, 282, 585, 595]. Путём параллельного обнаружения изменений в паттернах экспрессии тысяч генов (транскриптомика) можно наблюдать и идентифицировать ранние изменения в экспрессии конкретных генов, вызванные нефротоксинами в одном образце, что позволяет анализировать сложные механистические взаимодействия без необходимости повторных экспериментов. Токсикогеномика, относительно новая область токсикологии, относится к вызываемым веществами изменениям транскриптома для идентификации клеточных и субклеточных механизмов токсичности, измеряя паттерны экспрессии дифференциально экспрессируемых генов до и после обработки соединением. Гены, которые постоянно демонстрируют повышенную или пониженную экспрессию во время этих токсических реакций в модельных системах, служат маркерами для прогнозирования потенциальных неблагоприятных клинических исходов. Общей целью токсикогеномного анализа является определение механизма действия, посредством которого соединение вызывает токсический или неблагоприятный эффект [228, 229]. Для обнаружения отдельных аналитов обычно используют твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Например, доступны ELISA для наиболее многообещающих маркеров, таких как Kim-1 (Argutus Medical Ltd.), clusterin (BioVendor R&D), NGAL (BioPorto) [125, 167, 171, 269, 567]. BioAssay Works®, партнер-основатель Kirkegaard и Perry Laboratories, разработал быстрый и простой в использовании тест Dipstick для Kim-1 (крыса) и Kim-1 (человек), BioAssay Works и ее партнер Argutus Medical Ltd. теперь предоставляют тест-полоски Kim-1 под названием RENA-Strips [568]. В сотрудничестве с RBM компания Merck-Millipore (формально Merck-Chemicals) выпустила на рынок большое количество наборов с различными комбинациями маркеров нефротоксичности. Технология MULTI-ARRAY представляет собой комбинацию обнаружения электрохемилюминесценции и структурированных массивов на дне многолуночного планшета (максимум 10 точек в 96-луночном планшете, 4 пятна в 384-луночном планшете и 100 точек в 24-луночном планшете). Из-за короткого времени измерения, составляющего всего несколько минут, эта технология больше подходит для высокопроизводительного скрининга. Капиллярный электрофорез в сочетании с масс-спектрометрией (CE-MS) используется для диагностики тяжёлых заболеваний, включая повреждение почек на ранних стадиях развития. Поскольку антитела не используются, эта технология в принципе способна без значительных

ограничений обнаруживать повреждение почек путём измерения мочи различных видов (для тех, которые включены в базу данных) [228, 229]. Разработаны также мультиплексные панели Rat Kidney Toxicity Panel 1 (бета-2-микроглобулин, глутатионтрансфераза, Kim-1, TIMP-1, VEGF) и 2 (кальбиндин, кластерин, цистатин С, липокалин-2 и остеопонтин) [589].

Сравнение уровней экскреции биомаркеров с мочой у интактных самцов и самок крыс в возрасте 5-12 недель выявило более высокие уровни экскреции ЛАП, ГТФ, общего белка, белка, связывающего жирные кислоты (L-FABP), цистатин С (CyC) и β 2- МГ, и более низкий уровень экскреции Kim-1 у самцов крыс по сравнению с самками крыс. Кастрированные самцы крыс показали более низкие уровни экскреции с мочой ЩФ, ЛАП, ГТФ, НАГ, глюкозы, общего белка, L-FABP, CyC, β 2- МГ и липокалин-2 (NGAL), но более высокие уровни экскреции с мочой кластерина (CLU) и Kim-1, чем у ложнопериоперированных самцов. С другой стороны, не наблюдалось значительных различий в уровнях экскреции биомаркеров с мочой, за исключением ЩФ, между овариэктомизированными и ложнопериоперированными самками крыс [558]. CyC является ранним биомаркером ОПП и прогностическим фактором стойкого ОПП при лечении аминогликозидами [360].

На сегодняшний день проходит международная клиническая апробация тестов, позволяющих диагностировать поражение почек за 24-48 часов до появления клинических симптомов ОПП. Характеристика некоторых из них представлена в таблице 4. При токсических воздействиях, первоначально запускающих молекулярные изменения, переходящие в повреждение клеток, происходит поступление биомаркеров в кровь и мочу, а анализ динамики экскреции этих маркеров имеет существенный потенциал для разработки методов ранней диагностики ОПП, недостижимый с помощью рутинных тестов [55]. Для жизненно важных лекарств с потенциальным нефротоксическим действием одновременный мониторинг функциональных биомаркеров и биомаркеров повреждения может предоставить важную информацию для определения режима дозирования и продолжительности лечения, а также для предотвращения ОПП [261, 460]. Фармацевтические и биотехнологические компании регулярно используют биомаркеры для получения количественных характеристик воздействия, эффективности и безопасности лекарств, а также для информирования о планировании клинических испытаний в отношении выбора пациентов, методов лечения и результатов [246].

Молекула-1 повреждения почек (Kim-1) представляет собой трансмембранный белок 1 типа, который не обнаруживается в здоровой ткани почек. Уровни транскрипта гена, кодирующего Kim-1 (Kim-1/*Havcr1*), сильно активируются в дедифференцированных эпителиальных клетках проксимальных канальцев в почках после ишемического или токсического повреждения. Сэндвич-тест Kim-1 ELISA для определения эктодомена молекулы-1 повреждения почек (Kim-1/TIM-1/*HAVCR1/CD365*) имеет диапазон от 0,05 до 5 нг/мл с

межсерийной и внутрисерийной вариабельностью <10%. Образцы мочи собирали у крыс, получавших три дозы цисплатина (2,5, 5 или 7,5 мг/кг). Через один день после введения каждой из доз наблюдалось увеличение уровня эктодомена Kim-1 в моче примерно в 3-5 раз, в то время как другие обычно используемые биомаркеры (креатинин плазмы, азот мочевины крови, N-ацетил-бета-глюкозаминидаза в моче, глюкозурия, протеинурия) не обладали достаточной чувствительностью в отношении выявления признаков токсического повреждения почек [567-568].

Уровни экспрессии мРНК Kim-1/Navc1 в почках и белка Kim-1 в моче увеличивались дозозависимым образом после инъекции гентамицина в дозах ≥ 100 мг/кг. Среднее увеличение уровня белка Kim-1 в моче было в 11, 30, 82 и 260 раз выше, чем в контрольной группе Kim-1 ($0,166 \pm 0,141$ нг/мг креатинина), а среднее увеличение мРНК Kim-1/Navc1 в почках при воздействии гентамицина в дозах 100, 150, 200 и 400 мг/кг соответственно было в 41, 112, 240 и 514 раз выше, чем в контроле [616].

Мочевая экскреция альбумина и фактора трилистника-3 также сильно коррелировали со степенью повреждения почек при отравлении гентамицином [542].

В многоцентровом исследовании SAPPHIRE была изучена кинетика мочевой экскреции биомаркеров остановки клеточного цикла: тканевого ингибитора металлопротеиназы-2 (TIMP-2) и белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IGFBP7), при «общих почечных повреждениях» (крупная операция, рентгеноконтрастные препараты, ванкомицин, нестероидные противовоспалительные препараты и пиперациллин/тазобактам). Была выявлена значимая связь с риском развития ОПП ($p=0,02$), но не с конкретным типом воздействия ($p=0,22$). За исключением радиоcontrastного препарата, у пациентов с развитием ОПП 2-3 стадии, после одного из пяти воздействий, наблюдалось явное изменение концентрации в моче $[TIMP-2] \times [IGFBP7]$ через 24-48 часов. У пациентов без ОПП повышения содержания в моче данных маркеров не выявлено [460].

NGAL (липокалин-2, связанный с желатиназой нейтрофилов) принадлежит к семейству альфа-2-микроглобулинов и наиболее изучен в отношении ОПП [28, 55, 83, 269, 392]. Выделение NGAL в мочу нефротелиоцитами на ранней стадии сигнализирует об ОПП при отравлении паракватом [252]. Иммуноферментный анализ (ИФА) и иммунотурбидиметрический анализ NGAL используются в ряде западноевропейских стран для подтверждения ОПП. Пороговые значения NGAL в моче 150 и 300 нг/мл продемонстрировали превосходную специфичность (92,4 и 97,1%, соответственно) и отрицательную прогностическую ценность (93,3 и 92,8%, соответственно) для исключения тяжёлого ОПП [255].

Для достижения клинической эффективности необходимо установить пороговое значение биомаркеров, обеспечивающее большую чувствительность, чем специфичность.

Таблица 4 – Характеристика некоторых основных и разрабатываемых биомаркеров ОПП

Биомаркер	Характеристика	Источник
1	2	3
Белок и плотность мочи при анализе тест-полосками (DSP и SG) и соотношение белок/креатинин мочи (РС-индекс)	Значения DSP и SG эффективно выявляют пациентов с протеинурией. Определены оптимальные корреляции между DSP-SG и РС-индексом, что дало 97,0% отрицательного прогностического значения (NPV) для РС-индекса 500 мг/г или менее и 97,5% положительного прогностического значения (PPV) для РС-индекса 500 мг/г или выше. NPV для РС-индекса 3000 мг/г или менее составляла 99,7%	183
Гамма-глутамилтрансфераза мочи (ГТФ)	У крыс, которым внутривенно вводили 160 мг/кг/день гентамицина в течение 4 дней, средняя активность гамма-глутамилтранспептидазы для контрольной группы (n=22) составила 5,68±0,26 МЕ/24ч, тогда как в группе, получавшей препарат, этот уровень был определён как 15,6±1,0 МЕ/24ч (n=15)	333
Ферменты мочи	Амфотерицин Б индуцировал достоверно более высокую суточную активность в моче ферментов почечных канальцев: N-ацетил-бета-глюкозаминидазы (НАГ), бета-глюкуронидазы (БГ), аланин-аминопептидазы (АлАП) и гамма-глутамилтрансферазы (ГТФ) по сравнению с контрольными животными. Значительное увеличение почечной экскреции происходило с 1 по 4 сутки. После лечения в течение 4 дней амфотерицином Б активность АлАП в моче составила 69±19 ЕД/г креатинина, контроль: 39±7 ЕД/г креатинина (p<0,05). Через 4 дня экскреция ГТФ увеличилась до 803±238 ЕД/г креатинина, контроль: 445±106 ЕД/г креатинина (p<0,05). На четвертые сутки экскреция НАГ составила 80±39 ЕД/г креатинина, контроль: 23±5 ЕД/г креатинина (p<0,05) и БГ 724±604 ЕД/г креатинина (амфотерицин Б), контроль: 276±158 ЕД/г креатинина (p<0,05). Лечение амфотерицином Б значительно снижало клиренс креатинина: 0,94±0,16 мл/мин по сравнению с контролем 1,35±0,29 мл/мин (p<0,05)	313
Креатинин сыворотки (SCr)	Достаточно надёжен для классификации и мониторинга хронической болезни почек (ХБП) в условиях стационара и оценки экскреции креатинина. У пациентов со сниженной мышечной массой SCr может не увеличиваться адекватно, несмотря на существенное снижение СКФ. Повышение уровня креатинина на 50% или более по сравнению с исходным уровнем 2 мг/дл расценивается как ранний признак острой почечной недостаточности. SCr является плохим функциональным маркером с ограниченной чувствительностью и специфичностью для точной оценки быстрых изменений СКФ. Не указывает на тубулярный некроз или последующее структурное повреждение почек	85

Продолжение таблицы 4

1	2	3
Мио-инозитолоксигеназа (МИОГ)	Почечно-специфический фермент в диагностике ОПП. Пороговая концентрация МИОГ была установлена на уровне 77,3 пг/мл с диагностической чувствительностью и специфичностью равными 53,8% (95% ДИ 37,2-69,9) и 81,5 (95% ДИ 65,7–92,3) соответственно для подтверждения ОПП. Однако значение площади под кривой (AUC) составило 0,694 (95% ДИ 0,579-0,794)	414
Липокалин-2 (NGAL)	<p>Уровни NGAL в плазме в группе с ОПП: медиана 310 против 86 нг/мл без ОПП; ($p < 0,001$). Исходные уровни NGAL позволили лучше прогнозировать ОПП, чем исходные уровни креатинина. AUC NGAL плазмы составляла 0,895 (95% ДИ 0,832-0,941) с пороговым значением 227 нг/мл (чувствительность 76,2%, специфичность 95,8%). NGAL плазмы имел более высокую прогностическую ценность для ОПП, чем креатинин сыворотки (AUC 0,741, 95% ДИ 0,662-0,810), дефицит оснований (AUC 0,795, 95% ДИ 0,701-0,870), лактат (AUC 0,781, 95% ДИ 0,690-0,856) и анионная разница (AUC 0,636, 95% ДИ 0,535-0,730)</p> <p>Концентрации NGAL достигают пика примерно через шесть часов после повреждения канальцев и следуют кривой доза-реакция в зависимости от тяжести повреждения. NGAL легко доступен в клинических лабораториях и, по сравнению с другими маркерами, имеет дискриминационное значение для прогнозирования неблагоприятных событий, связанных с почками. Точность NGAL для прогнозирования тяжёлой SCr-ОПП была от умеренной до хорошей (AUC для NGAL плазмы 0,802, 95% ДИ 0,793-0,811). Диагностическая точность и пороговые концентрации NGAL в моче и плазме повышались с увеличением тяжести ОПП</p>	83
	В множественном логистическом регрессионном анализе уровни NGAL в моче на 3-й день (ОШ 5,46, 95% ДИ 2,65-11,24), оценка по шкале SOFA в день поступления (ОШ 2,83, 95% ДИ 1,24-6,50) и концентрация мочевины в сыворотке в день поступления (ОШ 2,82, 95% ДИ 1,12-4,66) были независимыми факторами риска ОПП. Независимыми факторами риска смертности при многофакторном анализе были высокие концентрации NGAL при поступлении (ОШ 2,87, 95% ДИ 1,44-5,72). В наилучшей прогностической модели AUC ROC составлял 0,774 (95% ДИ 0,700-0,848), что указывает на хорошую способность различать пациентов с ОПП и без него	85
		118

Продолжение таблицы 4

1	2	3
Липокалин-2 (NGAL)	<p>NGAL в сыворотке и моче были выше у пациентов с множественной миеломой (ММ) с почечной недостаточностью, чем у пациентов с ММ без почек или у здоровых лиц (187,10 (45,60-699,60) против 136,70 (47,70-216,50) против 117,7 (69,3-192,3), $p<0,01$; 37,50). (6,30-412,10) против 18,00 (0,50-66,50) против 11,2 (0,9–69,1), $p<0,01$). Однофакторный анализ: NGAL в сыворотке (ОШ 1,009; 95% ДИ 1,002-1,017; $p=0,018$) и в моче (ОШ 1,038; 95% ДИ 1,003-1,073; $p=0,031$), а также СуС в сыворотке (ОШ 9,875; 95% ДИ 1,685-57,882; $p=0,011$) были сильными предикторами риска повреждения почек у пациентов с ММ.</p> <p>NGAL в моче отрицательно коррелировал с расчётной скоростью клубочковой фильтрации (pСКФ) ($r = -0,586$, $p=0$)</p>	204
	<p>Пороговые значения NGAL в моче 150 и 300 нг/мл продемонстрировали превосходную специфичность (92,4 и 97,1% соответственно) и отрицательные прогностические значения (93,3 и 92,8% соответственно) для исключения тяжёлого нефротоксического ОПП у детей (аминогликозиды и ванкомицин)</p>	255
	<p>Медиана концентрации pNGAL была значительно ниже в группе выздоровления (165 нг/мл (межквартильный интервал 113-266)) по сравнению с группой без выздоровления (371 нг/мл (межквартильный интервал 201-519)) ($p<0,001$). Среди выживших ($n=138$) pNGAL предсказывал невозможность восстановления функции почек с площадью под кривой (AUC) 0,71 (95% ДИ 0,61-0,81). AUC для прогнозирования восстановления ОПП с использованием uNGAL на 2, 4, 6 и 8 дни составляли 0,813, 0,854, 0,884 и 0,969 соответственно. NGAL мочи ранний маркер выздоровления от ОПП по сравнению с креатинином крови</p>	235
Цистатин С (СуС)	<p>Свободно фильтруется в клубочках и полностью расщепляется клетками проксимальных канальцев, не секретируясь и не реабсорбируясь; концентрация цистатина С в крови косвенно отражает СКФ</p>	85, 613
	<p>СуС вместе с мочевиной крови и креатинином сыворотки используется для оценки почечной функции и СКФ. Высокий уровень СуС связан со снижением СКФ, предсказывают стадию и прогрессирование почечных заболеваний.</p>	91
	<p>Среди пациентов с ОПП уровни sСуС были достоверно выше по сравнению с пациентами без ОПП ($1,06\pm 0,29$ против $0,89\pm 0,28$ соответственно, $p=0,026$). ROC-анализ: cut-off sСуС составил 0,94 мг/л с чувствительностью 63% и специфичностью 66% [AUC: 0,67, $p=0,026$] у пациентов в критическом состоянии</p>	239

Продолжение таблицы 4

1	2	3
Цистатин С и NGAL	СуС и NGAL на 3-й день лучше предсказывали ОПП от умеренной до тяжёлой (стадия 2 или 3) по сравнению с лёгкой формой ОПП (стадия 1). СуС мочи и NGAL, но не TIMP-2 × IGFBP7 мочи, были статистически связаны со смертностью. Эти биомаркеры являются хорошими предикторами тяжёлого ОПП, их можно использовать для прогнозирования потребности в ЗПТ	118
Тканевой ингибитор металлопротеиназы-2 (TIMP-2) и белок 7, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IGFBP7)	Одобрены для оценки риска поражения почек FDA (США). Имеют высокую специфичность в отношении острого канальцевого стресса, быстро увеличиваются в моче и могут предсказывать умеренное или тяжёлое ОПП (стадия 2–3 по KDIGO) в течение 12 часов после измерения биомаркеров. AUC 0,80 (95% ДИ 0,74-0,84) и 0,79 (95% ДИ 0,69-0,88) соответственно для тяжёлого ОПП. Мета-анализ диагностической точности [TIMP-2]×[IGFBP7] для ОПП показал чувствительность 0,76 (95% ДИ 0,69-0,82) и специфичность 0,48 (95% ДИ 0,44-0,51) для порогового значения 0,3 нг/мл 2/1000 в течение 12 часов после поступления в отделение интенсивной терапии (ОИТ). Чувствительность и специфичность для порогового значения 2,0 нг/мл 2/1000 составляли 0,42 (95% ДИ 0,34-0,51) и 0,94 (95% ДИ 0,92-0,95) соответственно, а идентифицированная объединённая AUC составила 0,75	85
	Уровни TIMP-2 × IGFBP7 предсказывали ОПП только в образцах мочи, собранных при поступлении. NGAL и цистатин С повышаются примерно за 48 часов до развития клинического синдрома ОПП, тогда как считается, что TIMP-2 и ИФРСБ7 предсказывают развитие ОПП в течение 12 часов. TIMP-2 × IGFBP7 не был значимо связан с развитием ОПП на 3-й день	118
Молекула-1 повреждения почки (Kim-1)	Нефротоксические вещества (цисплатин, НПВП и аминогликозиды) приводят к усилению экспрессии Kim-1 клетками почек. Уровень Kim-1 в сыворотке крови был связан и коррелировал с иммунным ответом на повреждение проксимальных канальцев почек вследствие нефротоксического повреждения. Kim-1 в сыворотке более чувствительный маркер, чем мочевины и креатинин крови для обнаружения острого повреждения почек вследствие нефротоксичности	91
	Молекула-1 повреждения почек Kim-1 показала значительное увеличение уровня у животных, получавших гентамицин (увеличение в 20 раз), и амфотерицин Б (увеличение в 9,2 раза). Мочевой уровень Kim-1 продемонстрировал большую чувствительность к повреждению как проксимальных, так и дистальных канальцев	208

Продолжение таблицы 4

1	2	3
Молекула-1 повреждения почки (Kim-1) Липокалин-2 (NGAL)	Индукцированное отравлением паракватом ОПП диагностировано у 11 из 20 пациентов. Уровень NGAL в моче был выше у пациентов с ОПП по сравнению с пациентами без ОПП через 24 ч (2,84 против 0,96 нг/мл). Мочевой Kim-1 не отличался при сравнении пациентов с ОПП и пациентов без ОПП. Независимо от ОПП, NGAL и Kim-1 повышались между 24 и 48 часами	252
Молекула-1 повреждения почки (Kim-1) Кальбиндин Фактор трилистника 3 (TFF3)	В ответ на начало химиотерапии цисплатином концентрация Kim-1 в моче увеличилась по сравнению с исходным уровнем и оставалась повышенной в течение последующего цикла химиотерапии. Уровни кальбиндина в моче были повышены через 10 дней после первоначального лечения цисплатином, но практически не изменились при воздействии цисплатина в последующем цикле. Раннее повышение TFF3 в моче через 3 дня после введения цисплатина постоянно наблюдалось как в начальном, так и в последующем цикле лечения цисплатином.	245
Тканевой ингибитор металлопротеиназы-2 (TIMP-2) и белок 7, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IGFBP7)	Уровни TIMP-2 × IGFBP7 предсказывали ОПП только в образцах мочи, собранных при поступлении. NGAL и цистатин С повышаются примерно за 48 часов до развития клинического синдрома ОПП, тогда как считается, что TIMP-2 и ИФРСБ7 предсказывают развитие ОПП в течение 12 часов. TIMP-2 × IGFBP7 не был значимо связан с развитием ОПП на 3-й день	118
Белок 7, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IGFBP7)	IGFBP-7 в моче (uIGFBP-7) адекватно предсказывал восстановление функции почек (uIGFBP-7 AUC: 0,74;) и был связан с продолжительностью ОПП. IGFBP-7 был более точным предиктором почечного исхода, чем uNGAL	235
Циклофилин А (СурА)	Цитозольный СурА высвобождается на ранних стадиях некроптоза как биомаркер этого типа гибели клеток. Высокие уровни СурА обнаруживаются в почках. uСурА повышался сразу после операции (значения uСурА были в 14-33 раза выше исходного уровня). Cut-off максимального значения при повреждении >10 нг/мг креатинина мочи. Корреляция между uСурА и uNGAL была слабой и статистически значимой только для пациентов с пережатием артерии. Результаты свидетельствуют о том, что uСурА более чувствителен, чем uNGAL для выявления повреждения почек, вызванного ишемией-реперфузией	146
Продукты глубокого окисления белков (АОРР)	Уровни АОРР в образцах плазмы, дефибринированной плазмы и сыворотки давали площадь под ROC-кривой 0,80 (95% ДИ 0,73-0,88), 0,92 (95% ДИ 0,87-0,97), и 0,90 (95% ДИ 0,85-0,96) соответственно при различении заболеваний сердца и сосудов у пациентов с гемодиализными пациентами	170

Продолжение таблицы 4

1	2	3
Трансформирующий ростовой фактор- β (TGF- β)	TGF- β опосредует эффекты в канальцевых, эндотелиальных и интерстициальных компартментах, которые потенциально могут приводить к развитию ХБП после ОПП. Задержка TGF- β по крайней мере на 2 дня после травмы позволит лучше понять роль этого важного фактора роста в переходе от ОПП к ХБП	249
Ванин-1	После введения высокой дозы цисплатина (10 мг/кг однократно внутривенно) или гентамицина (120 мг/кг в сутки, один раз в сутки внутривенно в течение 9 дней), ванин-1 в моче определялся раньше, чем другие биомаркеры. У крыс, получавших низкую дозу цисплатина (5 мг/кг, однократная внутривенная доза) или гентамицина (40 мг/кг в сутки, однократная внутривенная доза в течение 9 дней), креатинин сыворотки и NAG в моче не изменялись на протяжении всего исследования, в то время как мочевого vanin-1, Kim-1 и NGAL были значительно увеличены. Уровни почечного белка ванина-1 были значительно снижены у крыс, получавших более высокую дозу цисплатина на 5-й день и гентамицина на 9-й день, а метод иммунофлуоресценции подтвердил, что иммунореактивность ванина-1 в канальцевых клетках снижалась со временем от начала отравления	299
Интерлейкин-18 (IL-18)	Данные 11 исследований в 3 странах с участием 2796 пациентов были отмечены ограничениями гетерогенности порогового и непорогового эффекта. Во всех условиях диагностическое ОШ уровня IL-18 в моче для прогнозирования ОПП составило 5,11 [95% ДИ 3,22-8,12] с чувствительностью и специфичностью соответственно 0,51 и 0,79. AUC ROC-кривой уровня IL-18 в моче для прогнозирования ОПП составила 0,77 (95% ДИ 0,71-0,83). Анализ в подгруппах показал, что уровень ИЛ-18 в моче у детей (<18 лет) и время раннего прогнозирования ОПП (<12 ч) были более эффективными в прогнозировании ОПП с диагностическими ОШ 7,51 (2,99-18,88), 8,18 (2,19-30,51)	375

Сравнительный мета-анализ двух или более биомаркеров повреждения почек продемонстрировал умеренные дискриминационные характеристики AUC <0,75 для NAG и CyC и <0,70 для Kim-1, NGAL, IL-18 и L-FABP для прогнозирования ОПП в течение 24 часов. TIMP-2 и IGFBP7 показали наилучшую прогностическую ценность (AUC=0,86), CyC в моче был вторым наиболее эффективным биомаркером (AUC = 0,79), а наибольшее количество доказательств было доступно для NGAL с AUC = 0,72 [570]. IL-18 в моче имеет лишь умеренную диагностическую ценность [375]. По уровню CyC, как и концентрации креатинина,

можно вычислить скорость клубочковой фильтрации [466]. Кроме того, дисфункцию канальцев можно распознать по повышенной почечной экскреции низкомолекулярных белков, наличию зернистых цилиндров и эпителиальных клеток почечных канальцев (RTEC) в осадке мочи [570]. Так, патологические изменения осадка мочи (гематурии и лейкоцитурии) и появление протеинурии, были выявлены у 24% пациентов на фоне приёма НПВС и анальгетиков [4], а общий анализ мочи в сочетании с микроскопией позволял понять локализацию и причину острого повреждения почек [413]. Оценка ≥ 2 по системе оценки мочевого осадка ОКН является чрезвычайно надёжным предиктором ОПП [470-472].

Экспериментально показано, что через 4 часа после инъекции малеата натрия имело место значительное увеличение концентрации мочевины и примерно 15-кратное увеличение концентрации моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1) в плазме, что контрастно отличалось от лишь двукратного увеличения уровня NGAL. Учитывая, что малеат вызывает специфическое повреждение проксимальных канальцев *in vivo*, сходное с синдромом ишемии-реперфузии почки, это преимущественное увеличение MCP-1 в плазме по сравнению с NGAL указывает на высокую чувствительность MCP-1 как биомаркера ОПП, что также подтверждается выраженным увеличением мРНК MCP-1 в корковом слое почек и экскреции белка MCP-1 с мочой [434]. В исследованиях группы A. Ortiz (Испания) было установлено, что гибель нефротелиоцитов по пути некроптоза является ключевой особенностью ОПП, и за немедленной волной гибели клеток в прямом ответе на повреждение может последовать вторая волна гибели клеток через 48-72 часа, вызванная местным воспалением и летальными цитокинами, продуцируемыми в ответ на исходное повреждение и первую волну провоспалительного воздействия. Выделение с мочой ещё более чувствительного, чем NGAL биомаркера – циклофилина А (СурА), который высвобождается при некроптозе нефротелиоцитов, увеличивается во время клинического, индуцированного ишемией-реперфузией, повреждения почек независимо от параметров их функции [146]. Повышенная экспрессия семафорина 3А из класса секреторных белков в подоцитах, дистальных канальцах и собирательных трубках возникает при хром-(VI)-индуцированном ОПП в результате активации пути рапамицина mTOR и повышенный уровень в моче семафорина 3А является ценным биомаркером раннего ОПП, вызванного воздействием хрома [535].

Протеинурия является следствием повреждения почек и признана независимым фактором риска сердечно-сосудистых, почечных заболеваний и предиктором поражения органов-мишеней [76, 309, 449, 464]. Однако качественные тесты на протеинурию и гематурию имеют низкую чувствительность [438]. Значения уровня белка при измерении тест-полосками и плотности мочи эффективно идентифицируют пациентов, нуждающихся в количественной оценке протеинурии с помощью соотношения белок-креатинин, а определение соотношения

белок-креатинин в точечных образцах мочи является точным, удобным и надёжным методом оценки экскреции белка с мочой [156, 484]. Для рутинных исследований степени суточной протеинурии также предложены расчётные уравнения, основанные на величинах белка в моче, измеренных с помощью тест-полосок, и плотности [183, 394, 606, 607]. Электрофорез является наиболее доступным методом определения качественных особенностей протеинурии [76, 120, 220, 221, 464]. Тубулярный тип протеинурии обнаружен при острой почечной недостаточности, отравлении фенацетином, витамином Д, при гипоксии, т.е. факторов ишемически-гипоксического или токсического воздействия [76]. Для количественного определения белковых фракций метод денситометрии является наиболее простым по технике выполнения, достаточно точным и поэтому наиболее перспективным. По данным лаборатории патофизиологии уремии в Генуе (Италия) в образцах мочи было обнаружено 1118 зон, из которых только 275 были охарактеризованы как изоформы 82 белков [148]. На основе детального сравнительного комплексного анализа пептидома релевантных образцов плазмы и мочи от 22 пациентов было установлено, что 90 пептидов обнаруживаются как в моче, так и в плазме. Большинство плазменных пептидов не выявляются в моче из-за их канальцевой реабсорбции. Остальные мочевые пептиды могут иметь истинно почечное происхождение [397]. Альфа-пептиды коллагена и фибриногена были выявлены в гемодиализате, моче и плазме крови, а в отработанном гемодиализате тимозин β_4 является одним из наиболее распространённых пептидов [282]. В образцах плазмы и мочи мышей, под воздействием эpsilon-токсина штаммов *C. perfringens* и с использованием подхода 2DE-MS, было идентифицировано в общей сложности 52 белка – фибриноген, аполипопротеин, амилоидный белок сыворотки, плазминоген, сывороточный альбумин, глутатионпероксидаза, трансферрин, основной белок 2 в моче, гаптоглобин, транстиретин и витамин D-связывающий белок [110]. Компания Metabolomics предложила повышенное соотношение хинолинат/триптофан в моче (uQ/T) у человека в качестве показателя, предсказывающего ОПП [480].

Цитологическое изучение мочевых осадков проводится в двух вариантах – качественного или полуколичественного определения, а также количественного определения (методы Каковского-Адисса и Нечипоренко) [79]. При количественном методе определяют в мочевом осадке исключительно лейкоциты, эритроциты и цилиндры [470-472]. Из-за сложной морфологии клеток верхних мочевых путей, отсутствия корреляции с тяжестью течения патологии почек современные методы их количественного определения не разработаны. В рутинном анализе мочи на автоматических анализаторах мочи современного типа методом импеданса определяют клетки типов плоского, переходного и почечного эпителия, сперматозоиды, а также лейкоциты, эритроциты и кристаллы солей (оксалатов, трипельфосфатов и некоторых других). В то же время для дифференцирования эритроцитов по

происхождению проводится оценка их морфологии – изоморфного и дисморфного типа, что позволяет отличать эритроциты, выходящие в мочу из клубочков почек (эхиноциты), от эритроцитов из нижних мочевых путей (изоэритроциты) [63, 78, 79, 470, 471, 475]. Однако эти результаты сильно зависят от осмоляльности мочи, потому что при гипостенурии все клетки эритроцитов подвержены онкозису (осмотическому лизису), а при щелочной реакции рН мочи – выщелачиванию. Также у разных видов животных клетки имеют иные размеры и расположение ядра, что требует значительного профессионального опыта исследователя при проведении микроскопического анализа осадков мочи экспериментальных животных для верной интерпретации полученных данных [93, 416].

Для цитологического исследования мочу обычно центрифугируют с целью обогащения клеток не менее чем в 10 раз от исходного объема мочи, взятого для анализа. Далее, мочевой осадок встряхивают и переносят на предметное стекло для ориентировочного анализа, при котором в неокрашенном осадке проводится определение всех типов эпителия, клеток крови, цилиндров, слизи, половых клеток, бактерий, паразитов и солей. Следует отметить, что макрофаги мочи могут быть приняты за гигантские клетки переходного эпителия и клетки почечного эпителия, а включения полиовирусов в клетках также делает их морфологию неузнаваемой. Для упрощения дифференцирования и одновременно повышения точности определения типа клеток мочи применяются суправитальные красители Штернхаймера [539] и Штернхаймера-Мальбина, состоящие из фталоцианинового и ксантенового красителя, или же из смеси кристаллического фиолетового с сафранином [196, 603]. В человеческой моче этими красителями ядра и цитоплазма клеток окрашиваются в характерные цвета, что позволяет дифференцировать клетки мочевых осадков с высокой точностью. Для определения наличия воспаления в почках важными цитологическими маркерами являются лейкоциты. Однако, они могут присутствовать в моче в клинически значимых количествах, но иметь различное происхождение: из верхних или нижних мочевых путей.

Метод прямого микроскопического наблюдения при окрашивании по Райту-Гимзе и Штернхаймеру-Мальбину (SM) был использован для скрининга клеток Декой (клетки, инфицированные вирусом полиомы) в образцах мочи 213 пациентов с трансплантацией почки, которые принимали иммунодепрессанты. Среди них клетки Декой были обнаружены в 40 случаях (18,8%) методом прямого наблюдения, в 44 случаях (20,7%) при окрашивании по Райту-Гимзе и в 49 случаях (23,0%) при окрашивании SM. Кроме того, наиболее распространённые вирусы полиомы, вирусы ВК и JC, также были подтверждены в 41 (83,7%) случае среди этих 49 образцов, положительных на клетки Декой. Важно отметить, что по сравнению с другими методами обнаружения клеток Декой, окрашивание SM происходит быстро, легко и имеет

высокий процент положительных результатов. окрашивание SM рекомендуется как быстрый и эффективный метод скрининга клеток Декой мочи у пациентов с трансплантацией почки [603].

В диагностике токсических нефропатий главное место отводится мишени воздействия прямых нефротоксинов – тубулярному эпителию. Клетки тубулярного эпителия встречаются одиночные, а также группами, пластами, в составе наложений в гиалиновых цилиндрах, а при массивном отторжении в виде эпителиальных цилиндров или железистоподобных структур при нефронекрозе [461, 470-472]. По своей морфологии клетки почечного эпителия неправильной, округлой, угловатой или вытянутой каплевидной формы, в 1,5-4,5 раза крупнее лейкоцитов, с окрашенной цитоплазмой мочевым урохромом в светло-жёлтый или коричневатый цвета [46, 68, 138, 416]. Цитоплазма тубулярного эпителия содержит дистрофически изменённые вакуоли, содержащие жир. Наличие жира в клетках почечного эпителия можно обнаружить при поляризационной микроскопии (в форме мальтийского креста) или при окраске суданом или нильским синим.

Статистические методы оценки связи биомаркеров с ОПП обеспечивают процесс валидации и на начальной стадии анализа данных (описательная статистика) для каждого биомаркера у человека рассчитываются базовые статистические показатели [10, 11, 65]: минимальные и максимальные значения, процент обследуемых, у которых значение биомаркера превышает уровень чувствительности (LOQ) или предел обнаружения (LOD), а также геометрическое среднее. Также можно рассчитать значения перцентилей – значения переменной, ниже которых попадает определённый процент наблюдений: 50-ый перцентиль (P50; медиана), 90-ый перцентиль (P90) и 95-ый перцентиль (P95). Кроме того, можно рассчитать доли результатов, превышающих референсные значения или значения на основе воздействия на здоровье. Значение БМЧ-II (cut-off 2) согласно немецкой комиссии по биомониторингу человека представляет собой концентрацию ксенобиотика в биологических материалах человека, при превышении которой наблюдается более высокий риск негативного воздействия на здоровье. Значение БМЧ-II – это пороговое значение для проведения вмешательств и принятия мер. Если концентрация вещества превышает значение БМЧ-I (cut-off 1), но не достигает значения БМЧ-II, необходимо выявить потенциальные источники экспозиции [10, 11].

Несмотря на существование в настоящее время достаточного количества биомаркеров поражения почек, их общим недостатком является недостаточная специфичность для разграничения острых и хронических заболеваний почек, межгосударственные различия в стандартах диагностики заболеваний, ни один из зарегистрированных биомаркеров почек не является полностью специфичным для ОПП [460]. Дискутируется вопрос о том, что биомаркеры острого повреждения не поддаются однозначной интерпретации до повреждения почек и для

оценки риска ОПП у пациентов [460]. Новые диагностические критерии должны включать в себя как гломерулярную функцию ультрафильтрации, так и биомаркеры повреждения канальцев почек в равной степени для диагностики ОПП, и что биомаркеры и концентрация креатинина крови (текущий эталонный тест) представляют информацию о различных типах поражения почек. Нефрологи не должны рассматривать текущие биомаркеры повреждения канальцев почек в качестве замены для измерения креатинина крови и диуреза (оба из которых являются плохими эталонными стандартами), а должны понимать их автономную полезность для прогнозирования состояния пациента, выявления структурного повреждения почек. Нефрологи и специалисты других специальностей должны осознавать ограничения не только креатинина крови, но и биомаркеров повреждения почек. Будущие исследования должны быть сосредоточены на механизмах повреждения, чтобы расширить знания о фенотипах ОПП на основе их патофизиологии и уточнения понимания лежащей в их основе биологической последовательности от почечного стресса до субклинических или клинических форм ОПП [85].

Патоморфологические методы позволяют изучать механизмы нефротоксичности на органном, тканевом, клеточном и субклеточном (ультраструктурном) уровнях организации ткани почек [18, 35, 46, 382, 384, 393, 416, 424, 427, 435, 522]. Для гистологического исследования почек проводят фиксацию биоматериала в нейтральном растворе формалина или жидкости Дюбоска-Бразилиа по Буэну [18, 35, 46, 64, 97]. В случае фиксации нефробиоптатов в жидкости Дюбоска-Бразилиа образцы фиксируют 6-24 часов с последующей постфиксацией в нейтральном формалине также 6-24 часов. Далее ткани проводят по восходящим спиртам и заключают в парафиновые блоки. Срезы изготавливают толщиной 1-3 [610, 618] и 4-5 [364, 365] мкм для последующей окраски. В литературе встречается рекомендация по следующим видам окрашивания срезов почек для изучения почечной патологии: обзорная окраска гематоксилином и эозином, PAS-окраска по Шиффу (базальные мембраны и мезангиальный матрикс интенсивно красно-фиолетовые, ядра – синие), PASM окраска (PAS + метенамин серебра – базальные мембраны и мезангиальный матрикс черные, иммунные комплексы – слегка коричневые), трихром по Массону (ядра черные, цитоплазма, коллагеновые волокна, слизь – сине-зелёные, иммунные депозиты и фибриноид – оранжево-красные), AFOG (комбинация анилиновый синий, кислый фуксин и оранж Ж; гиалиновые капли – ярко красные, базальные мембраны и соединительная ткань – синие, эритроциты – жёлтые или жёлто-зелёные) и ряд других методик [618]. По мнению шотландского патолога А.Ч. Лендрума структурные изменения выявляют при полихромной окраске по Пикро-Маллори [364, 365]. Путём кропотливого исследования широкого спектра красителей он разработал способы наилучшей визуализации и идентификации различных типов клеток и связанных структур. Эти методы

позволили более чётко интерпретировать изменения в кровеносных сосудах, почках и других органах.

Полуколичественная оценка патологических изменений в почках часто используется для обнаружения структурных изменений при различных вариантах нефропатологии и является простейшим вариантом морфометрического анализа [46, 64, 331, 416]. Данный подход имеет важные преимущества в виде быстроты оценки общепатологических признаков и высокая степень воспроизводимости. Методы балльной оценки по шкалам выявляют различные параметры на светооптическом или электронно-микроскопическом уровне, такие как интерстициальное воспаление, расширение просвета канальцев (атрофия), тубулит, утрата щёточной каймы, наличие цилиндров в просветах канальцев, отек, митозы, слияние клеток градуируемые, например, по Vanff-классификации на: i0 – отсутствие или нормальное состояние интерстиция, i1 – воспаление до 25% паренхимы, i2 – 26-50% площади паренхимы воспалено, i3 – воспаление распространено более чем на 50% площади паренхимы [416]. Однако полуколичественные шкалы имеют ряд ограничений, связанных с эффектом сжатия ткани, субъективностью специалиста, а измерения объема структур или параметров распределения клеток могут быть оценены только при стереологическом анализе [416, 618].

Морфологические классы наиболее часто встречающихся острых форм токсических нефропатий были описаны нефропатологом М.Д. Михатч в созданной базе данных NephroTox [443] и включают в себя:

- Тубулoneкротический острый канальцевый некроз (ОКН). Отличительной чертой ОКН является некроз в основном проксимальных канальцев. В наиболее тяжёлых формах все канальцы вовлечены в одинаковой степени, а в других случаях канальцы с полным некрозом могут быть обнаружены рядом с сохранёнными. Некротический эпителий отрывается от нижележащей базальной мембраны, просветы канальцев заполняются клеточным дебрисом. На этой стадии морфогенеза канальцы становятся окружёнными нейтрофилами, клеточный дебрис в канальцевых просветах также может содержать нейтрофилы. Разрушение базальной мембраны не характерны. Базальная мембрана может не окрашиваться по PAS (Шиффу) или серебром, но её разрушение (тубулорексис) не наблюдается. Промежуточное пространство (интерстиций) расширяется отёком. На более поздних стадиях происходит регенерация эпителия (митозы). Восстановление нефротелия приводит к нерегулярной выстилке базальной мембраны недифференцированными эпителиальными клетками. Цитоплазма может быть такой же тонкой, как у эндотелия. Ядра часто увеличены, могут быть найдены многоядерные эпителиальные клетки. Интерстициальный фиброз и рассеянные лимфоциты и гистиоциты обычно присутствуют. Со временем может произойти полная регенерация нефротелия. Этиологические причины: амфотерицин В, ванкомицин, колистин, препараты висмута,

повидон-йод, ртуть, металлические, цефалоспориновые антибиотики, аминогликозиды, бацитрацин, рифампицин, фоскарнет, тенофовир дизопроксил, адефовир дипивоксил, ифосфамид, цитарабин, пликамицин, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, ингибиторы кальцинейрина, зомепаирак, бисфосфонаты, парацетамол.

- Вакуолярная трансформация нефротелия без явного некроза. Гидропическое изменение. Наиболее распространённой формой тонкого вакуолярного изменения нефротелия является гидропическое изменение («осмотический нефроз»). Развитию осмотического нефроза способствует предшествующее почечное повреждение с хронической почечной недостаточностью или шоком любой этиологии. При вскрытии почки увеличены и бледны. Гистологически гидропическая дистрофия характеризуется очаговой или реже диффузной трансформацией «прозрачных клеток» проксимальных канальцев, показывающей изометрическую тонкую вакуолизацию цитоплазмы. В основном вовлечена прямая часть проксимального канальца, а в тяжёлых случаях также извилистая часть. Сильно поражённые канальцы часто видны рядом с канальцами нормального вида. Дистальные канальцы и собирательные трубки более или менее не изменены. Иногда могут поражаться париетальные эпителиальные клетки, выстилающие капсулу Боумена, подоциты или интерстициальные клетки, которые могут образовывать вакуоли. Ранние изменения гидропической дистрофии представляют собой крошечные пузырьки под апикальной клеточной мембраной. При дальнейшем развитии количество везикул постепенно увеличивается, заполняя цитоплазму. Из-за слияния вакуоли увеличиваются в размерах. Большинство вакуолей кажутся пустыми при оценке с помощью световой и электронной микроскопии. На поздних стадиях вакуоли могут содержать аморфный электронно-плотный материал. Ядро постепенно смещается к базальной части клетки и искажается соседними вакуолями. Митохондрии и другие клеточные органеллы остаются неизменёнными. Канальцевая вакуолизация вызывает постепенное набухание клеток и может привести к сужению, но не полной окклюзии канальцевых просветов. С помощью электронной микроскопии и ферментной гистохимии вакуоли были идентифицированы как лизосомы. Последствия осмотического нефроза непредсказуемы, в большинстве случаев вакуолизация полностью исчезает без последствий. В других случаях с длительной почечной недостаточностью вакуолизация может сохраняться без дальнейших существенных морфологических изменений почки. В нескольких случаях с необратимой почечной недостаточностью следует ожидать канальцевой атрофии, интерстициального фиброза и сопутствующего воспаления. Этиология: наблюдается после введения гипертонических инфузионных растворов, радиоконтрастных сред, внутривенного введения иммуноглобулина и нефротоксичности ингибитора кальцинейрина или дискразии плазматических клеток (в основном при болезни накопления лёгких цепей каппа иммуноглобулина G в нефротелиоцитах).

Отмечается также, что гидропические изменения могут присутствовать без какого-либо из вышеупомянутых этиологических факторов.

Жировая дистрофия. Тонкое вакуолярное изменение нефротелиоцитов наблюдается в случае накопления липидов. Окраска на липиды легко позволяет дифференцировать жировые изменения / пенистые клетки от гидропических. В парафиновых срезах «гидропическое изменение» может быть неотличимо от накопления липидов. При жировых изменениях вакуоли впервые видны в базальном отделе проксимальных канальцевых клеток, возможно выявление «пенистых» клеток. В случае накопления липидов пенистые клетки часто обнаруживаются в интерстициальном пространстве до такой степени, которую никогда не наблюдают при осмотическом нефрозе. Жировые изменения и пенистые клетки могут наблюдаться при нефротическом синдроме, печёночной недостаточности и интоксикациях.

Варианты вакуолярной дистрофии. Грубые вакуоли в дистальных канальцах встречаются при гипокалиемии. Вакуоли в основном обнаруживаются в дистальных канальцах, сопровождаемых PAS-позитивными гранулами в собирательных трубках. Гипокалиемия при этом должна быть тяжёлой и длительной, независимо от этиологии. Хроническое злоупотребление слабительными может быть одним из факторов. Очень мало крупных вакуолей может наблюдаться в проксимальных канальцах после терапии рапамицином. Нерегулярные мелкие и грубые вакуоли присутствуют при ишемическом поражении почек. Проксимальные канальцы содержат вакуоли переменного размера, сопровождающиеся потерей границы, образованием пузырьков, часто с десквамацией эпителия от базальной мембраны и признаками регенерации. При интоксикации этиленгликолем и диэтиленгликолем обнаруживаются грубые и даже гигантские вакуоли в основном в проксимальных канальцах. Кристаллы оксалата кальция в больших количествах присутствуют в случае отравления этиленгликолем, но не при интоксикации диэтиленгликолем. Этиологическими факторами выступают: маннитол, сорбитол, декстран, желатиновые коллоидные растворы, гидроксиэтилкрахмал, октреотид, иммуноглобулины, сиролimus, такролимус, циклоспорин, инкрутин, рентгеноконтрастные среды, этиленгликоль, диэтиленгликоль.

- Острый интерстициальный нефрит (ТИН) без гранулём. Острый интерстициальный нефрит при биопсии даёт крайне неоднозначную патоморфологическую картину. В отдельных случаях кора и мозговой слой могут быть диффузно заполнены инфильтрирующими клетками или присутствуют мультифокальные инфильтраты. В спектре патологии также обнаруживаются редкие инфильтраты, особенно в переходной медуллярно-корковой зоне, без каких-либо других инфильтратов в коре или мозговом веществе. Тубулит присутствует всегда, но может возникать часто или очень редко. Тубулит обычно труднее обнаружить при ТИН. При ТИН в основном поражаются дистальные канальцы. Однако тубулит можно не заметить из-за того, что очень

много клеток проникает в каналцы, так что каналец исчезает внутри инфильтрата. Разрушения канальцевой базальной мембраны обычно не обнаруживают. Возможно, что базальная мембрана не окрашивается PAS или серебром. Обычно присутствуют интерстициальный отек и разная степень повреждения эпителия каналцев, например, некроз каналцев, апоптоз, десквамация, более поздняя регенерация и дедифференцировка эпителия.

Состав интерстициального инфильтрата изменчив: большинство инфильтрирующих клеток всегда составляют лимфоциты и гистиоциты, могут встречаться плазматические клетки или эозинофильные лейкоциты. Наличие скоплений эозинофилов или плазматических клеток позволяет дифференцировать различные типы ТИН. Нейтрофильные лейкоциты также присутствуют в различных количествах; особенно каналцы, содержащие debris, могут быть окружены нейтрофилами. На очень ранних стадиях ТИН некоторые канальцевые базальные мембраны могут быть плотно покрыты нейтрофилами [443].

Этиологическими факторами ТИН являются: тетрациклин, миноциклин, ацетилсалициловая кислота, антагонисты H_2 -рецепторов (циметидин, ранитидин, фамотидин), ингибиторы протонного насоса (омепразол, пантопразол, рабепразол), субцитрат висмута, колистин, сульфасалазин, месалазин, варфарин, тиклопидин, стрептокиназа, аймалин, ибупрофен, метилдопа, гидрохлортиазид, индапамид, фуросемид, триамтерен, ницерголин, пропранолол, амлодипин, дилтиазем, каптоприл, эналаприл, клофибрат, фенофибрат, гризеофульвин, ацикловир, напроксен, пропилтиоурацил, пенициллины с расширенным спектром, цефалоспорины первого, второго, третьего поколения, азтреонам, сульфаметоксазол и триметоприм, макролиды, линкозамиды, фторхинолоны, полимиксин В, производные имидазола, производные нитрофурана, рифампицин, изониазид, этамбутол, нуклеозиды и нуклеотиды искл. ингибиторы обратной транскриптазы, фоскарнет, индинавир, атазанавир, адефовир дипивоксил, целекоксиб, интерфероны, интерлейкины, сиролimus, такролимус, азатиоприн, фенилбутазон, индометацин, сулиндак, толметины, зомепирак, диклофенак, кеторолак, оксикамы, кокаин, фенобарбитал, фенотиазины с алифатической боковой цепью, клозапин, диазепам, сульфат меди [443].

Патоморфологические методы в совокупности с физиологическими и молекулярно-биологическими приёмами позволяют изучать патогенез токсических нефропатий [88, 127, 310, 340, 356, 618]. Методы исследования сосудистых изменений также применимы для изучения патологии почек токсического генеза из-за тесной связи сосудистой и выделительной систем [124, 152, 160, 213, 324, 337, 358, 376]. Патоморфоз перехода ОПП в ХБП был изучен на мышинной модели нефропатии при отравлении фолиевой кислотой (250 мг/кг внутрибрюшинно однократно), которая повторяет течение болезни, характеризующейся ОПП в течение начальной острой фазы, длится в течение 3-5 дней с последующим изменением процесса почечной

репарации и прогрессированием до ХБП [389]. За мышами наблюдали в течение 4 недель. Авторами были подтверждены индивидуальные различия: у части опытных мышей наблюдалось выздоровление, в то время как у других животных прогрессировала ХБП. Через 28 дней после инъекции фолиевой кислоты у мышей развилась переменная степень ХБП. На основании уровня креатинина сыворотки каждого животного на 28-й день все животные были дихотомически разделены на подгруппы с низким и высоким содержанием креатинина в крови, соответствующие подгруппам с «хорошими» и «плохими исходами» ОПП. Подгруппа с «хорошим исходом» достигала уровня креатинина, практически сопоставимого с исходным уровнем. Напротив, у подгруппы с «плохим исходом» был подтверждён переход в ХБП, о чём свидетельствовало прогрессивное повышение уровня креатинина в сыворотке. Почки животных из подгруппы с «плохим исходом» имели уменьшенную форму почек с выраженной зернистой поверхностью, бледного цвета, и сниженным массовым коэффициентом почек, с типичной гистологической картиной прогрессирующей ХБП, характеризующейся канальцевой атрофией, интерстициальным фиброзом и воспалением. Более того, иммуноблот-анализом и иммуногистохимическим окрашиванием на фосфорилированный по серину 10 гистон H3 (ФГН3) было показано, что отличительной чертой подгруппы с «плохим исходом» по сравнению с подгруппой с «хорошим исходом» продемонстрировала большую задержку роста клеток почечных канальцев за счёт остановки клеточного цикла в фазе G2/M, что было связано с начавшимся фиброгенезом почек и переходом от ОПП к ХБП. Иммуноблот-анализ нитротирозина в почечных гомогенатах, маркера окисления белков и иммуногистохимическое окрашивание на 8-гидроксидезоксигуанозин (8-OHdG), окисленного нуклеозида ДНК, показали, что подгруппа при «плохом исходе» имела значительно большую степень окислительного повреждения почек, чем в подгруппе с «хорошим исходом». Постоянный окислительный стресс в подгруппе с высоким уровнем креатинина в сыворотке соответствовал длительному повреждению почечных канальцев, сопровождался длительной экспрессией липокалина-2, что было выявлено с помощью иммуноблот-анализа гомогенатов почек. Напротив, в подгруппе с низким уровнем креатинина в сыворотке экспрессия липокалина-2 и повреждение почечных канальцев постепенно снижались после ОПП [389].

Таким образом, результатом ОПП может быть тубулоинтерстициальный нефрофиброз в результате «неудачной» регенерации вследствие активации эпителиально-мезенхимального перехода (трансформации) 2 типа [378-380, 385, 465], аккумуляции в почечной ткани компонентов соединительно-тканного матрикса и рубцевания [5, 64, 94, 101, 142, 144, 187, 216, 247, 249, 489, 490, 517, 553, 578, 605].

1.4 Современные методы терапии нефропатий токсического генеза

Терапия нефропатий токсического генеза тесно связана с патофизиологией заболеваний почек [8, 9, 22, 28, 43, 48, 52, 55, 59]. С другой стороны, стратегия терапии отравлений согласно Голикову С.Н. (1986) строится на основе 4 принципов – ускоренного выведения токсических веществ, антидотной терапии, патогенетической и симптоматической терапии, а также предупреждения развития осложнений [25]. Таким образом в подходах к лечению токсической патологии почек необходимы методы как детоксицирующей, так и патофизиологической направленности. Клинических рекомендаций по лечению токсических нефропатий в рубрикаторе КР Минздрава России не зарегистрировано. В клинических рекомендациях по ОПП указано, что при развитии ОПП токсического генеза, необходима консультация токсиколога для определения способа детоксикации, включая диализные методы [32, 33, 325]. Рекомендации состоят из медикаментозной и заместительной почечной терапии. Консервативное (медикаментозное) лечение проводится в стадиях 1 и 2 ОПП. Выявление ведущего патогенетического механизма развития ОПП ориентирует врача на необходимость дополнительных консультаций смежных специалистов. Медикаментозная терапия включает в себя: поддержание адекватного кровоснабжения почек путём контролируемой инфузионной терапии изотоническими кристаллоидами, контроль и коррекцию жизнеугрожающих осложнений дисфункции почек – гипергидратации, уремической интоксикации, дисэлектролитемии и нарушений кислотно-основного состояния. Срочные меры к восстановлению объема циркулирующей крови рекомендованы, не дожидаясь завершения диагностики ОПП. Вовремя начатая инфузионная терапия позволяет снизить нефротоксичность используемых препаратов. Не рекомендованы диуретики для предотвращения развития или лечения ОПП [22, 32] за исключением корректировки гиперволемии, а также ограничено применение аминогликозидов и амфотерицина Б. В разработке методов искусственной детоксикации достигнут ряд успехов: созданы эффективные методы гемодиализа и гемосорбции и фильтрации, перитонеального диализа [24, 41, 48, 49, 50, 52, 59, 60, 63, 69, 72, 77]. Диализные методы заместительной почечной терапии (ЗПТ) считаются наиболее эффективными для быстрого удаления из циркуляции диализируемого токсического вещества [24, 25, 28, 41, 48, 562]. Физико-химическое и химическое взаимодействие антидотов с ядами относится к методам искусственной детоксикации [25, 43]. Проведение полноценной детоксикационной терапии при раннем поступлении больных с тяжёлыми и среднетяжёлыми отравлениями психофармакологическими средствами и прижигающими жидкостями предотвращало развитие азотемической нефропатии [44].

Методы искусственной физико-химической детоксикации включают в себя [44]:

- аферетические (гемаферез, плазмаферез, лимфаферез);
- диализные и фильтрационные (гемодиализ, перитонеальный диализ);
- сорбционные методы (гемо-, плазмо-, лифосорбция, энтеросорбция);
- физио- и химиогемотерапевтические методы (электрохимическое окисление).

В клинической токсикологии отравлений грибами применяют следующие методы детоксикации: промывание желудка для предотвращения экзотоксикоза (объем от 10 до 20 литров воды); кишечный лаваж в период до 4 суток после отравления с помощью солевого электролитного раствора (в дозе 300 мл/кг массы тела); гастроинтестинальная сорбция энтеросорбентами; селективная деконтаминация кишечника с помощью преимущественно мало или не всасывающихся антибиотиков; форсированный диурез с помощью салуретиков в дозах 1-2 мг/кг и проведения гемодилюции; не прямое электрохимическое окисление крови 0,05 % раствором гипохлорита натрия в физиологическом растворе натрия хлорида в дозе 1/6-1/8 от ОЦК; ультрафиолетовое облучение крови для фотоинактивации токсинов. Активные методы детоксикации при отравлении включают: гемосорбцию, гемодиализ (вещества с М.м. <500 г/моль), гемофильтрацию, гемодиафильтрацию, продлённый артерио- и вено-венозный гемодиализ и гемофильтрация, изолированную ультрафильтрацию; плазмаферез, плазмасорбцию и плазмодиализ; лимфатические методы и перитонеальный диализ [48, 49]. Следует отметить, что ни один из методов экстракорпорального очищения не подвергался контролируемым клиническим исследованиям в лечении пациентов с отравлениями и их эффективность требует подтверждения опытом и временем. Раннее начало ЗПТ увеличивало число пациентов, у которых наблюдались нежелательные явления (4 исследования, 899 участников: ОР 1,10, 95% ДИ от 1,03 до 1,16; I = 0%; доказательства высокой достоверности). По сравнению со стандартом, более раннее начало ЗПТ может сократить количество дней в ОИТ (4 исследования, 1056 участников: СР -1,78 дней, 95% ДИ от -3,70 до 0,13; I 2 = 90%; низкий уровень достоверности доказательств), но ДИ включал как пользу, так и вред [217]. В разделе фармакотерапии отравлений грибами присутствует только защитная печёночная терапия, биопрепараты, витаминотерапия, корректоры белкового обмена и плазменного гемостаза, антибактериальные средства, гормональная терапия, антиоксидантная терапия и гипербарическая оксигенация.

Метод энтеросорбции, основанный на пероральном приёме средств, способных адсорбировать в пищеварительном канале различные токсические вещества на своей поверхности, не вступая с ними в химическую реакцию, является одним из самых безопасных, не имеющих существенных противопоказаний и высокоэффективных. Энтеросорбенты классифицируют на катиониты, аниониты и полиамфолиты [7]. По типу соединения выделяют энтеросорбенты на основе углерода (активированный уголь, карболонг), кремния (полисорб

МП, энтеросгель), поливинилпирролидона (энтеродез, энтросорб), лигнина (фильтрум, полифепан), целлюлозы (микрористаллическая целлюлоза, карбоксиметилцеллюлоза), хитина (хитин, хитозан), бурых морских водорослей (альгисорб), анионообменных смол (холестирамин), природных пищевых волокон (альгинаты, пектины), торфа (сиал-С), природных минералов (смекта, неосмектин, каолин, белая глина, алюминия гидроксид, силикагель, цеолит). Элиминация токсических веществ, образующихся в кишечнике, оказывает позитивное действие на печень, почки, улучшая их функциональное состояние [44]. К прямому действию энтеросорбции относят сорбцию ядов и ксенобиотиков, веществ, участвующих в гепато- и гемоэнтеральной циркуляции, поступающих в желудочно-кишечный тракт с пищеварительными соками путём секреции и других механизмов массообмена. К опосредованному действию относят профилактику соматогенной стадии экзотоксикозов и функциональную разгрузку органов детоксикации. Так, было показано, что выделение креатинина при ОПП с кишечным соком происходит в проксимальном отделе тонкого кишечника, а введение энтеросорбента в ЖКТ приводит к уменьшению концентрации креатинина в крови. Альгинат натрия обладает высокой избирательностью сорбции ряда металлов, радионуклидов (свинца, кадмия, стронция, бария, радия, рутения, циркония, ниобия) и практически полным отсутствием сорбции жизненно важных микро- и макроэлементов из-за различий в прочности связывания катионов. Механизмом действия сорбентов, принятых внутрь при уремии, является сорбция уремических метаболитов из кишечного сока. Таким образом, введение энтеросорбентов может значительно снизить нагрузку на органы детоксикации и экскреции вследствие связывания токсинов и токсикантов [7].

Сочетание метода фармакотерапии глюкокортикостероидами с гемодиализом и перитонеальным диализом, гемоперфузией и плазмообменом было применено в лечении 51 пациента с отравлениями паутиниками в Швеции 1974-1999 гг. [291]. Из всех случаев полное восстановление почечных функций (креатинин сыворотки меньше 200 мкмоль/л) было достигнуто при применении: гемодиализа (12%), стероидной терапии с гемодиализом (8%), плазмообмена с гемодиализом (8%), ацетилцистеина с гемодиализом (2%). Результаты не были достигнуты при применении: перитонеального диализа (2%), гемодиализа (20%), перитонеального и гемодиализа (2%), плазмообмена и гемодиализа (14%), плазмообмена, гемоперфузии и гемодиализа (6%), фармакотерапии глюкокортикостероидами с гемодиализом (10%). Краткосрочные и долгосрочные результаты у 30 шведских пациентов показали, что лечение с помощью гемоперфузии и/или гемодиализа, начатых через 3-8 дней после приёма грибов, не влияет на клиническое течение интоксикаций паутиником [291].

Метод перитонеального диализа (ПД) путём выведения нефротоксинов через полупроницаемую мембрану собственной брюшины пациента применяется при наличии

противопоказаний для гемодиализа, таких как сосудистый коллапс или угроза кровотечений [24, 32, 386]. Перитонеальный диализ является интракорпоральным методом ЗПТ, но равноценной альтернативой гемодиализу он не считается. Принцип метода заключается в ускорении транспорта путём диффузии из кровеносных и лимфатических сосудов брюжейки и брюшины в диализирующий раствор. Аппаратно существуют отечественные (НИИ ХАИ) и импортные (Fresenius, Gambro и т.п.) установки для диализа. Состав типового диализирующего раствора включает в себя: глюкозу 2,5 или 4,8%, хлорид натрия 0,7%, хлорид калия 0,04%, хлорид кальция 0,03%, хлорид магния 0,017%, гидрофосфат натрия 0,007%, гидрокарбонат натрия 0,3% с добавлением на 1 литр 50000 Ед пенициллина, 2500 ЕД гепарина и 30 мл 0,5% новокаина [48]. Подогретый до 37,0-37,5°C раствор вводят в брюшную полость. Рекомендуемый режим прерывистого метода с экспозицией 30-45 минут составляет 5-10 смен. Добавка к диализирующему раствору альбумина, липидов или фуросемида приводит к увеличению клиренса. Применение ПД не показано в случае метаболического ацидоза с высокой анионной разницей. Преимуществом ПД перед гемодиализом является возможность удаления связанных с белками плазмы веществ за счёт их диффузии через фенестры в брюшине [48].

Антидотные свойства хелаторов и комплексонов токсичных металлов и радионуклидов находят применение в специфическом антидотном лечении отравлений [20, 25, 34, 64, 77]. Так, исследование нового лиганда ВРСВГ, содержащего две катехиновые группы и две группы аминокарбоновой кислоты, в декорпорации U(VI) и защите от острой нефротоксичности U(VI) у крыс показало, что однократные, профилактические или терапевтические схемы инъекции ВРСВГ эффективно увеличивали 24-часовую экскрецию U(VI) с мочой и снижали уровни U(VI) в почках и костях, а также образование микроядер и высвобождение ЛДГ из-за ингибирования проникновения U(VI) в клетки, вызывали ингибирование продукции внутриклеточных АФК [113]. Цинк ($ZnCl_2$ вводили подкожно в дозе 27 мг/кг) оказывал защитное действие при отравлении крыс самок дихлоридом ртути только при профилактическом введении [415]. Липоевая кислота и её метаболит дигидролипоевая кислота являются эффективными хелаторами токсичных металлов, не уступая по эффективности димеркаптосульфонату натрия [123]. Эффективным и безопасным антидотом при отравлении гликолями является фомепизол, а также стирипентол [137, 362, 409]. Цитрат натрия предотвращал кристаллурическую нефропатию, вызванную введением смеси меламина и циануровой кислоты вследствие растворения кристаллов метаболитов и ограничения набухания почек, вакуолизации и некроза проксимальных канальцев [168]. Пиридоксамин защищал почки от образования и отложения оксалатных конкрементов верхних мочевых путей в эксперименте с приобретённой гипероксалурической нефропатией [172]. Другое направление фармакотерапии нефротоксичности ртути возможно при применении конкурентных субстратов анионного

транспортёра OAT1. Пара-аминогиппурат (ПАУ), адипат и глутарат (но не сукцинат или малонат) по отдельности ингибировали поглощение Cys-S-Hg-S-Cys дозозависимым образом. Эти данные указывают на то, что переносчики органических анионов, вероятно, играют заметную роль в базолатеральном транспорте ионов ртути клетками проксимальных канальцев и в нефропатии, вызванной ртутью [611].

Основными направлениями подавления воспаления в почках являются угнетение синтеза и секреции провоспалительных хемокинов и цитокинов, нефрофиброза [164, 165, 245, 302, 345]. Так, глюкокортикостероидные средства (ГКС) угнетают транскрипцию генов всех провоспалительных цитокинов, а пульс-терапия метилпреднизолоном в течение трёх дней уменьшала уровень фактора некроза опухолей альфа в крови и моче [8, 9, 24, 52]. При токсической нефропатии есть риск развития как прямого токсического почечного поражения, так и развития идиосинкразического острого интерстициального нефрита, а применение ГКС под внимательным контролем является оправданным методом подавления любых иммунологических реакций в ответ на химическую травму почки [32, 33]. Аналогичное угнетение экспрессии вызывают ингибиторы кальцинейрина за исключением циклоспорина А, вызывающего индукцию синтеза TGF- β 1 [52, 214]. На ряде экспериментальных моделей нефропатий было установлена эффективность методов терапии растворимыми рецепторами TNF- α , ИЛ-1 и рецепторным антагонистом ИЛ-1; цитокин нейтрализующими моноклональными антителами; ингибиторами активации моноцитов и макрофагов; методов генной инженерии. Наибольшую перспективность по мнению Картамышевой Н.Н. и соавт. (2005) представляет разработка и применение блокаторов MCP-1 [31]. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента и рецепторов ангиотензина снижают макрофагальную инфильтрацию интерстиция почек [31], блокаторы рецепторов альдостерона снижают риск сердечнососудистой патологии [175]. Сакубитрил (ингибитор неприлизина) и валсартан уменьшали повреждение клубочков и канальцев у крыс с врождённым метаболическим синдромом и ожирением [270]. Блокаторы рецепторов эндотелина-1, наряду с предотвращением развития отёка лёгких при гипоксии и вирусных заболеваниях [152], также показали ренопротекторную активность в экспериментах и клиническом применении [31].

Растущее количество данных свидетельствует, что в патофизиологии прогрессирования поражения почек эпигенетические изменения тесно связаны с почечной гипоксией. Эксперименты на животных показывают, что коррекция гипоксии почек и применение антиоксидантов являются многообещающей стратегией для блокирования перехода ОПП в ХБП [40, 154, 193, 321, 506, 549].

Так, мексидол (этилметилгидроксипиридина сукцинат) проявлял выраженную нефропротекторную активность при ишемии почек в экспериментах и клинической практике

[61]. Малатная соль этого же основания 3-гидроксипиридина (этоксидол) корригировала свободнорадикальные процессы в почках и уменьшала нарушение экскреторной функции почек. Эффективность сукцината, фумарата и их производных при гипоксии обусловлена тем, что флавинадениндинуклеотид-опосредованный сукцинатоксидазный фрагмент цикла Кребса подавляется позже его никотинамидадениндинуклеотид-зависимого звена, а экзогенно введенные интермедиаты восполняют пул митохондриального сукцината, интенсифицируя образование макроэргов.

Выраженный нефропротекторный эффект фумарата натрия (конфумин) был выявлен при тепловой ишемии почек кроликов [61, 62]. Препарат поддерживает биосинтез макроэргов в ткани почек, предотвращает деструкцию нефротелиоцитов, окклюзию просветов канальцев, сладжирование эритроцитов в капиллярах микроциркуляторного русла, уменьшает выраженность биохимических признаков ишемического повреждения почечной ткани. При изучении механизма антиоксидантного действия было обнаружено, что внешне добавленный фумарат хорошо проникает в митохондрии нефротелиоцитов почек и вызывает отток либо [^{14}C]-малата, либо [^{14}C]-аспартата из загруженных митохондрий [106, 107]. Другие интермедиаты цикла трикарбоновых кислот также проявляют нефропротекторную активность. Так, малат натрия в дозах 3,5 мг/кг при введении мышам ограничивал нефротоксическое действие цисплатина [561]. Перекисное окисление липидов мембран рассеивает мембранный потенциал митохондрий из-за появления физических отверстий в липидном бислое, что приводит к гибели клеток почек, а экзогенный сукцинат предотвращает индуцированное АФК ПОЛ. В тоже время вклад окисления сукцината в образование НАДФН по сравнению с другими дыхательными субстратами относительно мал. Ферменты, участвующие в регенерации НАДФН (трансгидрогеназа, НАДФ $^{+}$ -зависимая изоцитратдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, глутаматдегидрогеназа), не используют в качестве субстрата сукцинат. Таким образом, антипероксидная активность изолированных митохондрий, поддерживаемых сукцинатом, ниже, чем у митохондрий, поддерживаемых субстратами пируватом и малатом, а также фумаратом [559]. Фумарат за счёт субстратного обращения цикла трикарбоновых кислот в митохондриях приводит к усилению синтеза эндогенного сукцината и, вероятно, оказывает влияние на мембранные рецепторы НСА2, активируя образование простагландинов и адипонектина, хотя эти эффекты были установлены для диметилфумарата и его метаболита метилфумарата [162]. Путь активации ядерного фактора Nrf2 также лежит в основе энергетического, антигипоксического и антиоксидантного действия фумаровой кислоты [81].

Противовоспалительная активность темпола (100 мг/кг массы тела, в/ж), как проникающего через мембрану поглотителя радикалов, обладающего супероксиддисмутазной (СОД) и каталазоподобной активностью, при ОПП, вызванного цисплатином, была клинически

значимой при отсутствии влияния на пролиферацию клеток [82]. Механизм действия данного препарата из класса нитроксидов пиперидина заключался в антиапоптозном и противовоспалительном действии, а также поглощении и нейтрализации внутриклеточных свободных радикалов и активных форм кислорода. Темпол способствовал снижению уровня мочевины и креатинина в крови животных с цисплатин-индуцированным ОПП. На фоне терапии темполом наблюдалось заметное снижение экспрессии маркеров воспаления NF- κ B и ЦОГ-2 в почках мышей [82].

Димефосфон оказывал нефропротекторное действие в дозе 50 мг/кг у крыс при отравлении тетрахлорметаном и гентамицина сульфатом за счёт ингибирования процессов ПОЛ, снижения уровня калия в крови, повышения уровня натрия, активации каталазы в почках отравленных животных. Димефосфон также нормализовал канальцевую реабсорбцию при интоксикации гентамицином [17].

Введение левокарнитина (20 мг/кг массы тела, в/в) отменяло индуцированный внутривенно-вводимыми препаратами железа окислительный стресс у больных с ХБП, получающих терапию эритропоезином и глюконат натрия, железа из-за анемии, о чём свидетельствует предотвращение повышения продуктов глубокого окисления белков АОРР и липокалина-2 (NGAL), преимущественно у пациентов с фенотипом гаптоглобина Hp2-2. Таким образом, левокарнитин ослаблял токсическое действие препарата железа у пациентов с ХБП [103].

Альфа-липоевая кислота снижала нефротоксичность ртути [123], а при длительном в течение 12 недель введении в дозе 50 мг/кг внутрижелудочно крысам проявила антиоксидантную, хелатную и антиапоптотическую активности при отравлении хлоридом кадмия [391].

Эдаравон обладал значительным нефропротекторным действием за счёт ослабления оксидативного стресса и экспрессии маркеров воспаления на модели индуцированной доксорубицином нефропатии у крыс. Профилактическое лечение эдаравоном в дозе 30 мг/кг массы тела у крыс за 14 суток до моделирования нефропатии значительно снижало уровень мочевины и креатинина в крови, а также TNF- α , IL-6, NO в почечной ткани и повышало уровень поглощения димеркаптосукцината технеция по сравнению с негативным контролем (доксорубицином) [193].

Ресвератрол увеличивал выживаемость крыс с септическим ОПП за счёт ингибирования воспалительных факторов и способствовал деацетилированию NF- κ B путём активизации SIRT1 на модели лигирования и пункции слепой кишки у крыс. По сравнению с группой контроля на фоне экспериментальной терапии ресвератролом креатинин сыворотки, азот мочи крови, цистатин С в сыворотке, липокалин, связанный с нейтрофильной желатиназой, молекула

повреждения почек-1, фактор некроза опухоли- α , интерлейкин- 1β , IL-6 и индекс повреждения почек были статистически достоверно снижены. Для ресвератрола была выявлена дозовая зависимость нефропротекторного действия диапазоне доз 3-10 мг/кг/сут [236].

Нефропротекторный эффект циластатина оценивали при ОПП у мышей, вызванном диклофенаком. Циластатин уменьшал степень ОПП, восстанавливая окислительно-восстановительный баланс, подавляя воспаление и уменьшая апоптоз нефротелиоцитов, а также ингибировал ОАТ и снижал почечное распределение диклофенака. Данное исследование показало, что циластатин потенциально может использоваться в клинической практике в качестве терапевтического средства для терапии нефротоксической реакции на диклофенак [306].

Устойчивая повышенная активность GSK3 β в почечных канальцах после ОПП ухудшает антиоксидантный ответ Nrf2 посредством механизма, независимого от Keap1, что приводит к стойким окислительным повреждениям, которые в конечном итоге обуславливают переход к ХБП. Защитный нефропротекторный эффект лития был связан с усиленным антиоксидантным ответом Nrf2 в почечных канальцах, характеризующимся увеличением накопления в ядре Nrf2, усилением индукции HO-1 и снижением окисления белка (нитротирозина) и нуклеозидов (8-OHdG), как показал иммуноблот-анализ гомогенатов почек и иммуногистохимическое окрашивание. Лечение мышей тригонеллином, низкомолекулярным ингибитором Nrf2, в значительной степени отменяло эффект лития на улучшение функции почек, гистологическое строение и окислительный стресс. GSK3 β -опосредованная Keap1-независимая регуляция активности Nrf2 может быть действенной терапевтической мишенью для предотвращения перехода ОПП в ХБП. Среди многих селективных ингибиторов GSK3 β литий является ингибитором первого поколения и для фундаментальных научных исследований обычно используется в качестве стандартного блокатора GSK3 β . Ингибирование GSK3 β отвечает за терапевтический эффект лития при ряде заболеваний, таких как острое повреждение головного мозга, хронические нейродегенеративные заболевания, нейтропения и т.д. В последнее время было показано, что краткосрочное использование микродоз лития на животных моделях заболеваний почек (острый тубулярный некроз и подоцитопатия) оказывает нефропротекторное действие [389]. Аналогичные изменения, но за счёт другого сигнального пути в отношении арсенита натрия в микродозах были продемонстрированы для объяснения механизма устойчивости к токсическому действию мышьяка. Вызванная арсенитом экспрессия ABCB6 (АТФ-связывающий кассетный транспортёр) регулировалась транскрипцией, но эта индукция не была опосредована Nrf2 [158].

Повреждение клеток почек приводит к выбросу огромного количества сигнальных молекул в окружающую среду и интерстиций. Концентрация аденозина в почке заметно

увеличивается при почечной гипоксии, ишемии и воспалении, а высокоселективный антагонист аденозинового рецептора A_3 (A_3AR) LJ1888 при нефропатии у мышей, вызванной адриамицином, ослабляет прогрессирование почечного фиброза и обладает ренопротекторным действием [418]. Агонист аденозиновых рецепторов A_2A также уменьшает фиброз почек [468]. Монтелукаст оказывал нефропротекторное действие на модели нефропатии, вызванной цисплатином. Взрослым самцам крыс *Sprague-Dawley* внутрижелудочно вводили монтелукаст (10 и 20 мг/кг/день) за 5 дней до и после однократного введения цисплатина (5 мг/кг, внутривенно). Ренопротективный эффект монтелукаста проявлялся посредством противовоспалительных и антиапоптотических свойств [233]. Ингибирование некроптозного белка RIPK1 с помощью некростатина-1 (Nec-1), ослабляет гентамицин-индуцированный некроз и активацию белка, подобного домену киназы смешанного происхождения MLKL и RIPK3 у мышей. Nec-1 также уменьшал воспаление и фиброз почек и значительно улучшал индуцированную гентамицином почечную дисфункцию у мышей. Кроме того, у нокаутных RIPK3^{-/-} мышей введение гентамицина не приводило к выраженному ОПП [304]. Экзогенно вводимый белок этилмалоновой энцефалопатии 1 (ETHE1) значительно снижал скорость клеточного апоптоза клеток, индуцированного добавлением соли урана [276]. Препараты с антиоксидантной активностью, ингибиторы обратного захвата аминокликозидов, индукторы экскреции и блокаторы кальциевых каналов доказали статистически значимую нефропротекцию [580]. При изучении новых ренопротекторных стратегий, таких как улучшение оксигенации почечной ткани, стимуляция индуцированных сигнальных путей и модуляция клеточного энергетического метаболизма, необходимо учитывать физиологическую гетерогенность почек [516].

Не вызывает сомнения перспективность терапии нефропатий токсического генеза лекарственными препаратами с полимодальным действием на сосудистое и иммунное звенья патогенеза [36]. Основным показанием для фитотерапии токсических нефропатий являются длительный приём препаратов, обладающих нефротоксическими свойствами, а также профилактика нефротоксичности химиопрепаратов группы платины, других цитостатиков, восстановительная терапия и реабилитация пациентов. Это обусловлено постепенным развитием терапевтических эффектов и наличием в составе большинства фитопрепаратов комплекса мембранопротекторных, противовоспалительных и антигипоксически действующих биологически активных веществ, стимулирующих естественные процессы регенерации и антиоксидантной защиты [26, 40, 70, 387]. Фармакодинамические свойства некоторых биологически активных веществ и фитопрепаратов представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Фармакодинамические свойства некоторых растительных средств и препаратов

Препараты	Модели	Эффекты и механизмы действия	Источник
1	2	3	4
Ресвератрол	Модель септического ОПИ	По сравнению с контролем выявлено снижение уровня провоспалительных маркеров (3 и 10 мг/кг), достоверно и дозозависимо ($p < 0,05$). Ресвератрол увеличивает выживаемость крыс с сепсисом за счёт ингибирования воспалительных факторов и предупреждает ОПИ, способствует деацетилированию NF-κB-p65 путём активизации SIRT1	236
Флавоноиды из растений (апигенин и кемпферол)	Почки стареющих крыс Блеомициновая токсичность	Влияние флавоноидов на экспрессию провоспалительных цитокинов, а также сигнальные молекулы, исследовали в индуцированных блеомицином стареющих клетках линии ВJ. <i>In vivo</i> активность апигенина в отношении подавления SASP была выявлена в почках крыс. Среди пяти природных флавоноидов апигенин и кемпферол сильно ингибировали экспрессию SASP. Эти флавоноиды ингибировали активность NF-κB p65 через сигнальный путь IRAK1/IκBα и экспрессию IκB	374
Эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG)	Кадмиевая нефропатия	EGCG облегчал индуцированное CdCl ₂ повреждение почек у крыс, подавлял уровень окислительного стресса, нормализовал почечный ферментативный антиоксидантный статус и уровень E-кадгерина, а также ослаблял избыточное образование TGF-β1, pp-Smad3, виментина и α-ГМА. EGCG также снижал продукцию miP-21 и miP-192 и повышал уровни miP-29a/b/c	163
<i>Alhagi pseudalhagi</i> , сухой экстракт травы	Сулемовая почка	Экстракт верблюжьей колючки оказывал выраженный нефропротекторный эффект, в значительной степени способствовал снижению выраженности токсемии. Под влиянием экстракта верблюжьей колючки содержание продуктов липопероксидации уменьшалось в 2,2-2,4 раза, а антиоксидантной активности увеличивалось в 1,4-2,2 раза	70
<i>Polygonum aviculare</i> Сухой экстракт травы	Сулемовая почка	Спорэкс обеспечивал достоверное снижение концентрации азотистых метаболитов в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой, а на 7 сутки опыта концентрация креатинина снижалась до значений физиологической нормы	70

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4
<i>Caragana spinosa</i> , сухой экстракт	Сулемовая почка	Экстракт снижал содержание в крови креатинина в 2 раза, мочевины – в 1,4-1,5 раза, калия – в 1,6-2,1	70
<i>Iris lactea</i> , сухой экстракт травы	Сулемовая почка	ЭК снижал содержание в крови креатинина в 1,8-1,7 раза, мочевины в 1,3 и калия в 1,4 раза	70
<i>Orthosiphonus stamineus</i> , сухой экстракт травы, Ортэкс	Сулемовая почка	Ортэкс (профилактическое введение) повышал скорость клубочковой фильтрации; механизм диуретического эффекта был связан с влиянием на Na ⁺ ,K ⁺ -АТФазу. Ортэкс оказывал ингибирующее действие на процессы свободнорадикального окисления липидов	70
	Ишемия почек	Ортэкс снижал интенсивность процессов перекисного окисления липидов, индуцированных острой ишемией почек, на что указывает достоверное снижение концентрации продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов и МДА в сыворотке крови и гомогенатах почек)	70
Нефрофит, сухой экстракт	Лекарственные нефропатии (канамицин, НПВС, туберкулостатики, урографин)	Нефрофит обеспечивал снижение токсического действия медикаментозных препаратов и улучшал морфофункциональное состояние почек. Основным механизмом нефропротекторного действия является ингибирование процессов перекисного окисления липидов и повышение активности ферментов антиокислительной защиты почек за счёт большого количества фенольных соединений	70
<i>Populus tremula</i> , настой, отвар, настойка коры	Гентамициновая нефропатия (гентамицин 50 мг/кг 7 дней)	Оказывают акваретическое и салуретическое действие, увеличивают выведение креатинина Ряд по убыванию фармакологической активности извлечения: отвар коры осины > настой коры осины > настой почек осины > настойка коры осины > настойка почек тополя 100 > 50 мг/кг	70
<i>Populus tremula</i> , Тремулоидин	Интакты крысы	В дозах 25 и 50 мг/кг оказывает акваретическое, салуретическое и выделение креатинина действие	70
	Гентамициновая нефропатия	Восстанавливает экскреторную функцию почек и предотвращает развитие ОПН	70

Для установления перспективных растительных средств был проведён анализ 75 многокомпонентных рецептов из 95 лекарственных растений стран Восточной Азии для лечения болезней почек [26]. Исключив из этого списка растения с сильнодействующими веществами и алкалоидами перспективными видами были отобраны: Частуха подорожниковая (*Alisma plantago-aquatica*), Астрагал виды (*Astragalus spp.*), Диоскорея ниппонская (*Dioscorea nipponica*), Эвкомия вязолистная (*Eucommia ulmoides*), Солодка уральская (*Glycyrrhiza uralensis*), Пион виды (*Peonia spp.*), Фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris*), Подорожник большой (*Plantago major*), Горец птичий (*Polygonum aviculare*), Имбирь аптечный (*Zingiber officinale*). Из-за существенных различий в западноевропейской медицине и традиционной восточной медицине группа заболеваний почек не могла быть дифференцирована в связи с невозможностью подобрать описываемым синдромам болезней почек нозологические эквиваленты [26].

Исследование извлечений из высушенного корневища *Alisma orientale Juzepzuk* (*Alismataceae*) показало, что этилацетатная фракция и н-бутанольная фракция обладают заметным мочегонным эффектом, при этом было обнаружено двойное влияние на функцию почек, включая повышение и ингибирование диуретической активности. Компоненты с сильной полярностью в *Alisma orientale* обладали антидиуретической активностью, что могло быть следствием усиления активности котранспортера хлорида натрия в дистальных канальцах. Дозы 100 и 400 мг/кг этилацетатной фракции и дозы 12,5, 25 и 50 мг/кг бутанольной фракции (липофильные вещества) экстрактов из *Alisma orientale* вызвали увеличение объема мочи и заметное увеличение содержания электролитов в моче [161].

Эпигаллокатехин-3-галлат облегчал индуцированное хлоридом кадмия повреждение почек, подавлял уровень окислительного стресса, нормализовал почечный ферментативный антиоксидантный статус и уровень Е-кадгерина, а также ослаблял избыточное образование TGF- β 1, виментина и α -SMA как маркеров перехода ОПП в ХБП и нефрофиброз [163]. В одной из работ экстракт *Schizolobium parahyba* при введении в малых дозах на экспериментальной модели ОПП, вызванного ядом *Bothrops jararaca*, не предотвращал индуцированное ОПП, гемолиз и потребление фибриногена [404]. Флавоноиды растений также проявляют выраженные нефропротекторные свойства при воздействии блеомицина [374]. Мочегонные свойства *Solidago spp.* доказаны на основании исследований, проведённых с золотарником обыкновенным (*S. virgaurea L.*), содержащем тритерпеновые сапонины, флавоноиды и фенолокислоты. Лейокарпозид (2-гидроксibenзил-2,4-дигидрокси-3-метоксибензоат-2,4-диглюкозид) был впервые выделен из *Solidago virgaurea var. Leiocarpa* (Benth / Grey) и был обнаружен у *Solidago virgaurea L.*, но отсутствует у видов *Solidago canadensis L.* и *Solidago gigantea Ait.* Лейокарпозид проявлял диуретическую активность у крыс, составляющую до 75%

от активности фуросемида (6 мг/кг). Действие лейокарпоза начиналось через 5 часов после введения и продолжалось до 24 часов. Флавоноидная фракция вторичных метаболитов *Solidago virgaurea* L. показала увеличение суточного диуреза на 88% со снижением экскреции калия и натрия и увеличением выведения кальция. Активные флавоноиды *Solidago virgaurea* подавляли активность ангиотензинпревращающего фермента. Ацилированные тритерпеноидные сапонины *Solidago virgaurea* могут временно изменять проницаемость клеточной мембраны и вызывать изменения ионного гомеостаза [70]. Детальное изучение механизмов диуретического действия лекарственных препаратов из растений на клеточном и молекулярном уровне начато относительно недавно [387]. Однако для профилактики и терапии токсических нефропатий прямых рекомендаций фитопрепаратов нет, а их назначение требует междисциплинарного подхода и определяется нефрологом [8, 28, 52, 55, 70, 72]. При носительстве токсичных металлов назначают безопасные растительные препараты канефрон Н, хофитол [70].

В связи со сказанным выше перспективность фитотерапии и назначения природных полифенолов в лечении токсических нефропатий очевидна, но для профилактики поражений или в период восстановления необходимы подтверждающие доклинические и клинические исследования [9, 40, 70, 161, 163, 236, 387, 563].

1.5 Заключение к обзору литературы

Экзогенные отравления наряду с травмами вносят существенный вклад в структуру общей заболеваемости населения во всём мире. Исследование этиологических факторов в России показало существенный дрейф с 1960-х по сегодняшний день видов и типов токсических веществ, вызывающих острые отравления и токсические нефропатии. Острые экзогенные отравления ядами, лекарственными средствами, природными токсинами могут обуславливать развитие ренального фенотипа острого поражения почек как наиболее типичного варианта токсической нефропатии. Нефротоксичность может варьировать от минимального до значительного некроза, от изменений отдельных функций канальцев до существенной почечной недостаточности и электролитного дисбаланса. Патологические механизмы ОПП весьма разнообразны, зависят от вида токсиканта и включают в себя прямое поражение эпителия почечных канальцев (нефротелиоцитов), нарушение транспорта анионов и катионов, реабсорбции белков, воспалительную реакцию, активацию оксидативного стресса и апоптоза, различные модальности регулируемого некроза, внутриканальцевую обструкцию кристаллами. При этом общей закономерностью патологии почек является схожесть структурных и функциональных нарушений, что определяет поиск специфических черт нефротоксических поражений почек.

Наряду с нефротоксинами природного и техногенного происхождения, большое число лекарственных препаратов из самых разных классов вызывают, как прямое прооксидантное и нефротоксическое действие в процессе реабсорбции и секреции в нефронах системой транспортёров органических анионов (ОАТ [566]) и катионов (ОСТ [429]), конкуренции за транспортные сайты и ферменты [569], так и опосредованное действие с участием иммунной системы, циклооксигеназного синтеза простагландинов, ренин-ангиотензин-альдостероновой системы внутрипочечных сосудов [4, 23, 25, 37, 56, 66, 71, 72, 77, 78, 90, 96, 115, 116, 129, 143, 281, 298, 336, 390]. По мнению основателя школы нефрологов-терапевтов заслуженного деятеля науки России Б.И. Шулушко современные знания о возможном воздействии лекарственных средств на почки так поверхностны, что одно «прикосновение» к этой проблеме ставит больше вопросов, чем находит ответов [78]. Нефропатии токсического генеза играют ведущую роль в нарушении гомеостаза всего организма и почечном варианте танатогенеза при смертельном отравлении нефротоксинами [12, 18, 42, 57, 59, 395, 396, 593]. Нефротоксины индуцируют первичные патогенетические сдвиги в почках, а при воздействии летальных доз оказывают также преренальное или сосудистое действие за счёт развития экстремальных клинических форм острой химической патологии (экзотоксический шок, централизация кровотока в тканях с β -адренергической стимуляцией сосудистых стенок и снижение кровообращения в тканях с α -адренергической рецепцией – почках), развитие снижения СКФ из-за включения обратной тубулогломерулярной связи [6, 12, 18, 19, 23, 25, 28, 39, 44, 48, 59, 64, 78, 160, 173, 474]. Экспериментальные подходы к исследованию токсических нефропатий включают в себя моделирование отравлений на животных, сбор биоматериала, проведение клинко-биохимических, физиологических, визуализирующих и патологоанатомических исследований [9, 21, 51, 64, 65, 66, 80, 88, 89, 93, 108, 110, 128, 230, 278, 346, 416]. Известно, что колебания переменных определяют необходимость отказа от фиксированных сроков изучения для разделения границ переходных процессов токсических нефропатий [25, 127, 128, 225, 229, 238, 250, 252, 330, 357, 392, 416]. Сроки изучения реакции, при этом, должны охватывать полную динамику развития нефропатии токсического генеза, которая естественно различается у разных видов животных и человека из-за особенностей эволюции адаптационной и регенеративной возможности почек, физиологических и гормональных различий в регуляции процессов мочеобразования [16, 19, 21, 25, 51, 64, 65, 66, 68, 93, 108, 140, 251, 420].

Для острой химической патологии характерным является последовательность событий от субклинического течения [572], специфического действия (фаза первичных реакций) к общим эффектам (вторичные нарушения гомеостаза) вследствие гемодинамических сдвигов [25, 101], а при хронической – наоборот. При отравлении смертельными дозами или развитии нефротоксического ОПП вследствие химиотерапии общие экстремальные сдвиги гомеостаза

несовместимы с жизнью [25, 314]. В случае острого и хронического токсического воздействия первичной мишенью являются тубулярные клетки (нефротелиоциты) [56, 59, 77, 98, 111, 115, 119, 130, 132, 145, 186]. Некрозу нефротелиоцитов предшествуют различные виды клеточных дистрофий: жировой (при отравлении хлорорганическими веществами), гидropической (при отравлении этиленгликолем, диэтиленгликолем, пестицидами) или гиалиновой (при отравлении грибными токсинами, токсичными металлами) [18], а также остановка клеточного цикла [315]. Гипоксия и начальная ишемия или нефротоксины вызывают повреждение цитоплазматических мембран нефротелиоцитов [96, 321, 506, 516, 519, 549]. Нарушение функции митохондрий сопровождается дефицитом энергии, необходимой для синтеза макроэрга АТФ, апоптозом и некрозом клеток [61, 62, 107, 158, 191, 199, 304, 377, 483, 495, 582, 601]. При токсических нефропатиях развивается тубулярная и тубулоинтерстициальная патология почек, которая проявляется в форме аутофагии нефротелия, острого тубулoneкроза и его вариантов, нефрофиброза, а также расстройства гемодинамики микроциркуляторного перитубулярного русла, поражения эндотелия, васкулитов [12, 18, 64, 101, 115, 119, 133], развития аутоиммунной патологии почек [39, 129, 341, 358], присоединения системной вирусной инфекции [271]. Генетически детерминированный морфогенез почек может быть модулирован фармакологическими агентами, протекать в ряде случаев в виде полноценной регенерации участков нефронов [98, 115, 131, 187, 216, 296, 478] или же цистогенеза, перехода в нефрофиброз с развитием ХБП [132, 133, 144, 157, 206, 227, 247, 249, 260].

Методы диагностики нефропатий на сегодняшний день включают количественное или качественное определение самих нефротоксинов [10, 42, 57, 67, 90, 92, 121, 122, 139, 149], ряда специфичных для почек сигнальных молекул – биомаркеров [91, 93, 95, 110, 125, 153, 235, 258, 402, 410, 554], выделяемых с мочой [27, 31, 76, 118, 120, 128, 141, 146, 156, 255, 353, 372, 515, 557] или накапливающихся в крови [59, 83, 85, 150, 170, 352, 600, 613], в том числе ферментов [64, 65, 73, 117, 205, 543], а также выявляемых с помощью мультимаркерных панелей [167, 171, 228, 229, 238, 251, 589]. При уремической интоксикации, в том числе у гемодиализных пациентов, в крови существенно увеличивается уровень продуктов глубокого окисления белков (АОРР) вследствие активации макрофагов и моноцитов [150, 170, 180, 188, 450, 521, 551, 591, 592], конечных продуктов гликирования белков [421, 518]. Диагностика токсических нефропатий основывается на совокупности клинических признаков [3, 6, 16, 19, 25, 32, 33, 77] и результатов лабораторных исследований крови и мочи [1, 27, 31, 32, 33, 41, 57]. В ранних фазах заболевания при отсутствии явных клинических проявлений (неолигурическом повреждении почек) отклонения могут выявляться исключительно лабораторными методами, характерными могут быть изменения в общеклиническом анализе мочи [138, 196, 470-472]. Анализ экскреции биомаркеров нефротоксичности имеет существенный потенциал для

разработки новых методов диагностики, так как ряд сигнальных молекул выделяются в кровь и мочу в стадии повреждения, что опережает во времени начало подъёма уровня функционального маркера скорости клубочковой фильтрации сывороточного креатинина [28, 55, 71, 325, 349, 460]. Для достижения клинической эффективности и окончательного диагноза необходимо установить пороговое значение уровня биомаркеров с высокой прогностической значимостью. Несмотря на существование в настоящее время большого количества биомаркеров поражения почек, их общими недостатками являются: невысокая специфичность в плане разграничения острых и хронических заболеваний почек, межгосударственные различия в стандартах диагностики заболеваний, нацеленность на оценку функции почек, высокая стоимость. Таким образом, биомаркеры необходимы для диагностики повреждения почек при экзогенных отравлениях и у пациентов, которым назначены нефротоксические препараты [10, 11, 14, 28, 55, 65, 67, 71, 72, 85].

Детоксикационную терапию ОПП токсического генеза наиболее целесообразно начинать в токсикогенную и раннюю соматогенную фазы отравления и включать в неё специфические антидоты и фармакотерапию [7, 13, 25, 34, 41, 43, 44, 48, 49, 50, 57, 137, 224, 336]. Диализные методы считаются наиболее эффективными при назначении в первые сутки после отравления [24, 43, 44, 48, 49, 50, 52, 69, 217, 291]. Фармакотерапия должна включать в себя цитопротекторные средства для обеспечения защиты нефротелиоцитов [2, 113, 154, 193, 516]. Анализ существующих подходов к проблеме показал, что нет единых критериев оценки степени и характера повреждений почек различными по месту действия нефротоксинами. Не в полной мере известны и расшифрованы также особенности механизмов повреждения нефрона и предикторы как начального повреждения почек, так и потенциальной тяжести отдалённых последствий интоксикации. Это не позволяет оптимизировать профилактику, неотложную и реабилитационную терапию токсических поражений почек. Многофакторный характер этиологии и патогенеза ОПП, функциональная неоднородность различных сегментов нефрона препятствуют достижению клинических успехов. При изучении новых ренопротекторных стратегий необходимо учитывать физиологическую гетерогенность почек [516].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

В диссертационном исследовании были применены главным образом нефротоксиканты прямого типа действия, которые вводили лабораторным животным с целью моделирования токсического поражения почек [65, 93, 101, 416]. В предварительных экспериментах подбирали дозы токсикантов на основании расчётных величин полумлетальных доз из научных литературных источников из экспериментов, а также при проведении изучения острой токсичности ряда лекарственных препаратов. Превалирующим путём введения нефротоксинов был парентеральный (внутривенный и внутрибрюшинный) через шприц с иглой. В случае лекарственных препаратов использовали пероральное введение через атравматический металлический зонд для интрагастрального введения (мышам и крысам). При необходимости и наличии у токсикантов выраженного местно-раздражающего действия введение осуществляли животным под анестезией (введение ксилазина и золетила).

2.1.1 Токсиканты и лекарственные препараты

Перечень токсикантов и нефротоксинов, а также их свойств представлен в таблице 6.

2.1.2 Методы исследования *in vitro*

Изучение *in vitro* проводили на монослойной эпителиальной культуре гипердиплоидных клеток MDCK (CCL34, почка Спаниеля), клеток LLC-MK2 (CCL7, почка обезьяны), являющихся модельными культурами клеток почечного эпителия [65, 416]. Клеточная линия MDCK (CCL34) London Line (пассаж 8/8) была получена из Influenza Reagent Resource, CDC&P, Atlanta, Georgia, США (кат. № FR-58). После получения проведён один пассаж для создания коллекционного банка и второй пассаж культуры для создания рабочего банка. Клетки были разморожены из криопробирки и имели начальный пассажный уровень 8/8/2. В ходе проведения исследования пассажный уровень после разморозки не превышал 20 пассажей. Клетки MDCK культивировали на среде альфа-MEM с добавлением глутамина (Биолот), LLC-MK2 – на среде 199 в присутствии 10% фетальной сыворотки (HyClone) при 37°C в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% углекислого газа. Пересев и культивирование клеток проводили без добавления антибиотиков. Для снятия клеток с поверхности культурального пластика применялся раствор трипсина-ЭДТА (Gibco). Клетки рассеивали каждые 72-96 ч с кратностью посева 1:20.

Таблица 6 – Перечень токсикантов и их свойств

Наименование	Физ.-хим. свойства	LD ₅₀ , мг/кг
Ртут диоксид	Бел. крист. порошок CAS: 7487-94-7 М.м. 271,52 г/моль	10 в/бр крысы
Кадмия хлорид	Бел. крист. порошок CAS: 10108-64-2 М.м. 183,32 г/моль	88 в/ж крысы
Свинца нитрат	Бел. крист. порошок CAS: 10099-74-8 М.м. 331,2 г/моль	2250 в/ж крысы
Уранил ацетат дигидрат	Желт. крист. порошок CAS: 6159-44-0 М.м. 424,146 г/моль	204 в/ж крысы 20 в/бр крысы
Калия бихромат	Оранж. крист. порошок CAS: 7778-50-9 М.м. 294,19 г/моль	190 в/ж крысы 15 п/к крысы
Мертиолят (тиомерсал)	Бел. крист. порошок CAS: 54-64-8 М.м. 404,81 г/моль	35 в/м крысы
Какодилат натрия тригидрат	Бел. крист. порошок CAS: 6131-99-3 М.м. 214,03 г/моль	1200 в/ж крысы
Темефос (авалон)	Бел. порошок CAS: 3383-96-8 М.м. 466,5 г/моль	2000 в/ж крысы
Цисплатин	Желт. крист. порошок CAS: 15663-27-1 М.м. 300 г/моль	26 в/ж крысы 3 в/бр крысы
Этиленгликоль	Вязк. бесцв. жидкость CAS: 107-21-1 М.м. 62,07 г/моль	8567 в/ж крысы
1,2-Дихлорэтан	Бесцв. жидкость с характерным запахом CAS: 107-06-2 М.м. 98,96 г/моль	770 в/ж крысы
Тетрахлорметан	Бесцв. жидкость с характерным запахом CAS: 56-23-5 М.м. 153,82 г/моль	2800 в/ж крысы
Уксусная кислота	Бесцв. жидкость с характерным запахом CAS: 64-19-7 М.м. 60,05 г/моль	3310 в/ж крысы 525 в/в мыши
Амфотерицин Б	Кор.-желт. порошок CAS: 1397-89-3 М.м. 924,08 г/моль	11,3 в/в крысы 1,2 в/в мыши
Гентамицина сульфат	Бел. крист. порошок CAS: 1405-41-0 М.м. 575,67 г/моль	96 в/в крысы 150 в/м крысы
Капреомицина сульфат	Бел. крист. порошок CAS: 1405-37-4 М.м. 752,8 г/моль	1191 п/к крысы
Пефлоксацина мезилат дигидрат	Бел. крист. порошок CAS: 149676-40-4 М.м. 465,49 г/моль	2500 в/ж крысы
Ацикловир	Бел. крист. порошок CAS: 59277-89-3 М.м. 225,21 г/моль	860 в/бр крысы 724 в/бр мыши
Амброксола гидрохлорид	Бел. крист. порошок CAS: 23828-92-4 М.м. 414,6 г/моль	380 в/бр крысы
Ацеклофенак натрия	Бел. крист. порошок CAS: 89796-99-6 М.м. 354,18 г/моль	150 в/ж крысы
Фуросемид	Крем. крист. порошок CAS: 54-31-9 М.м. 330,74 г/моль	2600 в/ж крысы 308 в/в мыши
Экстракт <i>Cortinarius speciosissimus</i> 1:2	Корич. жидкость с характерным запахом грибов (0,18% орелланина)	0,1/1,0 мл в/бр мышы/крысы
Экстракт <i>Galerina autumnales</i> 1:2	Корич. жидкость с характерным запахом грибов (0,23% альфа-аманитина)	0,5 мл в/ж мыши

При рассеве клеток на культуральные планшеты производился подсчёт клеток в суспензии в счётной камере Горяева. Рассев на планшеты (JETBiofil, Канада-Китай) производили по 100-200 мкл клеточной суспензии в лунку, концентрация клеток $1-3 \times 10^5$ /мл. В работу отбирали планшеты, где сомкнутость клеток составляла 95% и выше.

Все образцы, включая токсиканты, растворяли в поддерживающей питательной среде для клеток MDCK в течение 2 ч при постоянном перемешивании при комнатной температуре. В приготовленных растворах измеряли значение pH. При необходимости pH доводили до значений 7,2-7,5 с помощью 1 М кислоты хлористоводородной (добавление по каплям при постоянном перемешивании). Приготовленные растворы были профильтрованы через шприцевые фильтрующие насадки JETBiofil с диаметром пор 0,2 мкм и ПЭС-мембраной. Опыт ставили в 3 параллельных сериях для каждой концентрации. 24-х часовую культуру клеток MDCK, выращенную на 96-луночных планшетах (Рисунок 5), проверяли визуально в инвертированном микроскопе на целостность монослоя. Планшеты дважды отмывали средой, не содержащей сыворотки, после чего вносили вещества в соответствующей концентрации в объёме 200 мкл в каждую лунку. Клетки инкубировали с веществами при $+37^\circ\text{C}$ в присутствии 5% CO_2 24 часа, оценивая целостность монослоя по сравнению с контролем клеток и методом захвата нейтрального красного (NRU – neutral red uptake), количественно оценивающим жизнеспособность клеток.

Оценку токсичности испытуемых веществ и влияние нефропротекторов проводили методом NRU. Метод NRU, используемый при оценке цитотоксичности, основан на способности живых клеток поглощать краситель нейтральный красный (3-амино-7-диметиламино-2-метилфеназин гидрохлорид, ЕС: 209-035-8, CAS: 553-24-2, CI 50040) [134]. Для анализа поглощения нейтрального красного клетки обрабатывали при $+37^\circ\text{C}$ 200 мкл раствора нейтрального красного (50 мкг/мл) в полной среде, приготовленного из 1 мл 0,4% раствора и 79 мл полной среды [126]. Через три часа среду удаляли и заменяли на 200 мкл раствора, содержащего 1% формалина и 1% кальция хлорида на 15 секунд. Этот раствор сливали и заменяли на 200 мкл 1% уксусной кислоты в 50% этаноле и встряхивали 10 мин до получения однородного цвета. Высокая интенсивность абсорбции свидетельствует о нормальном уровне жизнеспособности клеток (VC). Интенсивность абсорбции фиксировали с помощью EPOCH2 и, получаемые значения оптической плотности, были использованы для статистической обработки данных. Измерение проводили при длине волны 540 нм против оптического контроля, которым служила 1-ая лунка каждого планшета A1 или H12, не засеянная клетками. Весь остальной протокол опыта выполняли с лункой оптического контроля так же, как и с остальными лунками, содержащими клеточный монослой. Среднее значение A_{540} контрольных лунок представляло 100% жизнеспособность (VC). Абсолютная оптическая плотность нейтрального красного,

экстрагированного из контрольных лунок с добавлением только растворителя веществ, показывает рост клеток 1×10^4 на ячейку за время эксперимента. Критерием входного контроля служила средняя величина оптической плотности контрольных лунок с монослоем клеток без воздействия токсиканта, которая составляла $A_{540} \geq 0,35-0,40$. После переноса данных в программу GraphPad Prism (зависимость доза-эффект) и их обработки в модели линейной регрессии определяли IC_{50} – среднеингибиторную концентрацию, подавляющую клеточный метаболизм на 50%. Эта величина служила объективным критерием токсичности веществ *in vitro*. Величиной порога цитопротекторной активности (ПЦА, мкг/мл) препаратов считали последнее разведение концентрации, в котором происходило увеличение цитотоксической концентрации IC_{50} токсиканта более чем в 1,3 раза.

Апоптоз клеток оценивали по степени деградации хроматина (с в.н.с., к.б.н. Т.Д. Смирновой). Клетки, выращенные на покровных стёклах, фиксировали в фиксаторе (этанол/уксусная кислота в соотношении 3:1), окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst-33258 и просматривали (не менее 10 полей зрения) в люминесцентном микроскопе с иммерсией. Результаты выражали в виде индекса апоптоза по формуле $ИА = (b/c) \times 100 \%$, где ИА – индекс апоптоза, b – количество клеток с апоптозом, c – общее количество клеток.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
B	b	VC	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	VC	b
C	b	VC	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	VC	b
D	b	VC	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	VC	b
E	b	VC	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	VC	b
F	b	VC	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	VC	b
G	b	VC	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	VC	b
H	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b

VC = untreated VEHICLE CONTROL
(mean viability set to 100%)

C₁ - C₈ = TEST CHEMICAL at eight concentrations
(C₁ = lowest, C₈ = highest)

b = BLANKS
(containing no cells, but treated with NR medium
and with NR Desorb solution)

Рисунок 5 – Схема планшета для *in vitro* исследований цитотоксичности и цитопротекторной активности. VC – контрольные лунки с клетками, C₁-C₈ – лунки с препаратом.

2.1.3 Животные и их содержание

Экспериментальные исследования выполнялись в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Работа с лабораторными животными была организована в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур»; «Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию вивариев СП 2.2.1.3218-14» (РФ, утв. 29 августа 2014 года № 51); Rus-LASA [36]; «Лабораторные животные» (положение и руководство, Российская Академия Медицинских Наук, Москва, 2003).

В работе были использованы мыши линии *C57BL/6J*, крысы белые беспородные, линии *Wistar*, *Sprague-Dawley* и кролики-самцы породы Советская шиншилла (филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ России, филиал «Электрогорский» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, ПЛЖ «Пушино», ПЛЖ «Рапполово»). Гуманное обращение с лабораторными животными было организовано в соответствии с Rus-LASA (2012) [36] и одобрено биоэтическим советом (ИТ № 1-2012 от 12.11.2012). Вещества вводили интратрахеально (и/т), внутримышечно (в/м), внутривенно (в/в), внутривентрикулярно (в/ж), внутрибрюшинно (в/бр) или подкожно (п/к).

Полнорационный корм для лабораторных животных, рецепт № ПК-120-2_173000 «Лабораторкорм» (Москва). Корм давали животным без ограничения. Корм не содержал патогенной микрофлоры, способной повлиять на результаты исследования. Животные получали чистую питьевую воду без ограничений. Вода в поилках была получена методом обратного осмоса на установке по очистке воды Millipore RiOs 30. Вода не содержала патогенной микрофлоры, способной повлиять на результаты исследования. В качестве подстилочного материала была использована гранулированная фракция (подстил для животных), фирма-производитель ООО «Лабораторкорм», Россия.

Животных разных видов содержали в отдельных помещениях вивария. Контроль параметров окружающей среды осуществляли ежедневно на всём протяжении исследования, он включал в себя контроль температуры и влажности. Фотопериод составлял: 12 часов ночь – 12 часов день при искусственном освещении лампами дневного света. Режим проветривания обеспечивал около 15 объёмов помещения в час.

В течение исследования ежедневно каждое животное было осмотрено: общее поведение и состояние животных. В дни введения токсикантов осмотр проводился в период первых 2 часов после отравления.

Уход и содержание животных осуществляли в соответствии со стандартными операционными процедурами вивария.

Животные содержались в клетках:

- мыши по 10 в клетке, тип клетки 2L (площадь пола клетки – 530 см²);
- крысы по 5 в клетке, тип клетки IV (площадь пола клетки – 1815 см²);
- кролики содержались в индивидуальных решетчатых клетках.

Клетки для животных были оборудованы стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением, стальным разделителем для корма и воды.

Эвтаназию проводили одномоментной декапитацией под наркозом (применялся ксилазин и золетил) или методом CO₂-эвтаназии (Vet Tech Solutions) с тотальным забором крови [181].

2.2 Методы исследования

2.2.1 Подготовка к исследованию

Каждый эксперимент был тщательно спланирован в отношении выбора вида животных и их пола и возраста, количества особей в экспериментальной группе, доз токсикантов для введения, пути и частоты введения на основании данных о фармако- и токсикокинетике, длительности наблюдения, методов обследования, частоты забора биожидкостей, внутренних органов на биохимические и морфологические исследования [65, 93, 190, 208, 219, 251, 285, 416, 448]. Длительность акклиматизационного периода для всех животных составила 14 дней. В течение этого времени регистрировали поведение и общее состояние, заболеваемость и смертность.

До начала исследования животных, отвечающих критериям включения, распределяли на группы с помощью метода рандомизации с использованием в качестве основного критерия массу тела, так, чтобы индивидуальное значение массы тела не отклонялось от среднего значения в пределах одного пола более чем на 10%. Точность используемых весов была верифицирована до начала исследования. Вес тела каждого животного определялся до исследования и еженедельно в течение всего эксперимента.

Каждому отобранному в исследование животному был присвоен индивидуальный номер, название исследования, номер исследуемой группы. Индивидуальные номера содержащихся в группе животных были указаны на карточке клетки. Метод маркировки: применение биологических красок для маркировки животных.

2.2.2 Токсикологические методы

Моделирование острого отравления нефротоксичными веществами

Все яды – типовые нефротоксины применяли в токсических ($1 \times LD_{50} - LD_{100}$) и субтоксических ($\leq 1 \times LD_{50}$ при многократном введении) дозах [20, 65, 101, 285, 416]. Общая схема (дизайн) экспериментов представлена на рисунке 6.

Отравление токсичными металлами. В качестве ядов использовали уранил ацетат дигидрат (УАД, $UO_2(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$), смешанный оксид урана состава U_3O_8 (продукт пиролиза диураната аммония), кадмия хлорид, калия бихромат, свинца нитрат и ртути дихлорид. Токсическую дозу соединений вводили однократно в/б (уранил ацетат 20 мг/кг, ртути дихлорид $HgCl_2$ 2 мг/кг), п/к (калия бихромат $K_2Cr_2O_7$ 15 мг/кг) или в/ж (кадмия хлорид $CdCl_2$ 88 мг/кг). Комбинированное отравление соединениями урана проводили путём введения в виде пыли смешанного оксида урана U_3O_8 в лёгкие и суспензии в скелетную мышцу, растворенного в деионизированной воде УАД в желудок в дозовом диапазоне по элементу от 1 до 100 мг [^{238}U]/кг массы тела и накожной аппликации путём погружения хвоста животного на 2/3 его длины в раствор 0,5 г/л в течение 10-60 минут. Хронический ТИН вызывали дихлоридом ртути (0,25 мг/кг на 1, 7, 14, 21, 28 сут п/к) или УАД (ежедневно 5 мг/кг в/ж в течение 18 недель).

Отравление металлоорганическими соединениями. В качестве ядов использовали мертиолят (тиомерсал), какодилат натрия и цисплатин. Токсическую дозу соединений вводили однократно в/в цисплатин 10 мг/кг, в/в на 1, 3 и 5 сутки цисплатин 2 мг/кг, в/м мертиолят 0,35 и 35 мг/кг или в/ж какодилат натрия тригидрат 1200 мг/кг.

Отравление фосфорорганическим соединением. Крысам внутрижелудочно вводили 50% эмульсию темефоса (Абат, Авалон[™]) однократно в дозе 2000 мг/кг.

Отравление техническими жидкостями. В качестве ядов, которые вводили однократно в/ж крысам, использовали этиленгликоль (3-12 мл/кг), 1,2-дихлорэтан (0,5 мл/кг), тетрахлорметан (2,5 мл/кг), уксусную кислоту 30% (10 мл/кг).

Малеат натрия вводили внутрибрюшинно (500 мг/кг).

Отравление лекарственными препаратами. В эксперименте использовали введение амфотерицина Б, ацикловира, ацеклофенака натрия, амброксола гидрохлорид, гентамицина и капреомицина сульфата, иматиниба и пefлоксацина мезилата, матамизола натрия, парацетамола, сульфадимезина, сульфамонетоксина, циклоспорина А, циклофосамида, флупиртина малеат и фуросемида в токсических дозах.

Отравление токсинами грибов. В эксперименте использовали экстракты плодовых тел грибов Паутинника красивейшего (*Cortinarius speciosissimus*) [290, 338], содержащего 2,2'-бипиридин-3,3',4,4'-тетрол-1,1'-диоксид – орелланин 9 ± 1 мг/г, и Галерины осенней (*Galerina*

marginata = *G. autumnalis*) [48], содержащей бициклические октапептидные аматоксины 190 ± 8 мкг/г. Экстракт из грибов готовили методом перколяции 50% этанолом в соотношении 1:2 (масса/объем). Токсическую дозу вводили однократно в/б крысам (Паутинник) и мышам (Галерина).

В эксперименте использовали экстракт плодовых тел грибов Паутинника красивейшего и Галерины осенней, которые были собраны в период 2010-2014 гг. в Гатчинском районе Ленинградской области, п. Красницы, идентифицированы по микологическим описательным признакам, микроморфометрии спор и содержанию токсинов хроматографическими и спектроскопическими методами. Токсическую дозу вводили однократно внутривенно.

Выживших животных выводили из эксперимента путём плановой эвтаназии с тотальным забором крови и проводили вскрытие. Регистрировали следующие показатели: клиническая картина отравления, динамика массы тела, смертность, данные вскрытия и гистопатологического исследования погибших животных, установление механизма умирания по данным гистологического анализа внутренних органов (для погибших животных), лабораторные показатели в моче и крови, гомогенатах внутренних органов.

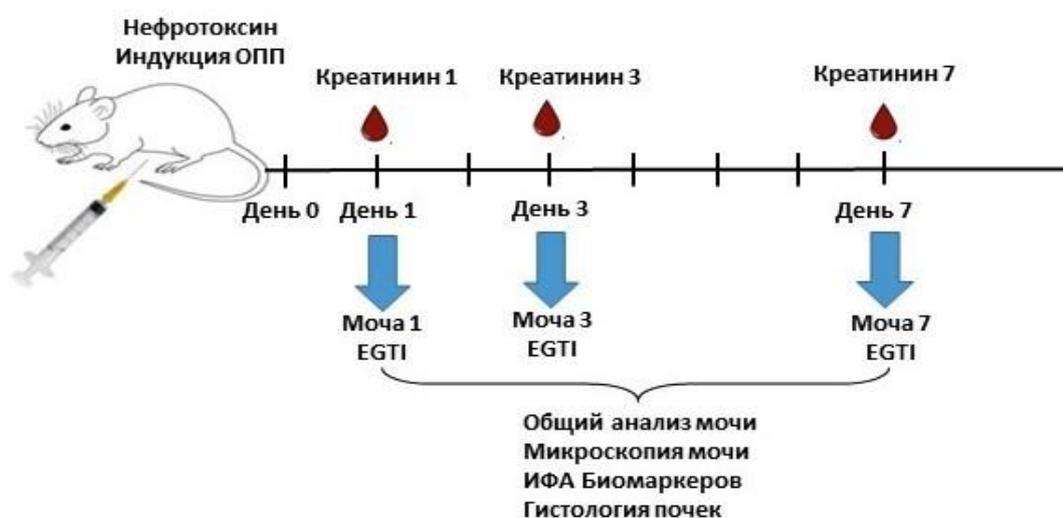


Рисунок 6 – Типовая схема токсикологических экспериментов на лабораторных животных.

2.2.3 Физиологические методы

Одной из основных величин, определяемых при обследовании животных, является объем мочи, образуемой за определённый промежуток времени (Д – диурез) [9, 64, 65, 66, 93, 101, 416]. Знание данной величины необходимо для оценки функционального почечного резерва, вычисления клиренса и других характеристик работы почек. В экспериментах количество мочи,

получаемой при произвольном опорожнении мочевого пузыря, в единицу времени считается условно диурезом, и эта величина не учитывает остаточную мочу в пузыре и мёртвое пространство, образуемое почечной чашечкой, лоханкой и мочеточниками. Также следует учитывать, что транспорт мочи из почек в мочевой пузырь является активным процессом, в работе которого задействована гладкая мускулатура стенок мочевых путей от почки до мочевого пузыря, а вегетотропные вещества (антагонисты кальция, ингибиторы фосфодиэстеразы, донаторы оксида азота, спазмолитики, холиномиметики, холинолитики, адреномиметики и адренолитики, нейротропные вещества) могут изменять величину суточного диуреза за счёт своего прямого или опосредованного фармакодинамического действия. При очень высоком диурезе возникает физиологическая гипотония мочеточников как за счёт гиперфльтрации и угнетения реабсорбции в канальцах, так и вследствие переполнения мочевого пузыря. Данные ограничения накладывают определённую условность в результатах вычисления клиренса креатинина, а более объективными показателями в экспериментах на животных становятся концентрационные индексы (КИ) аналитов в моче и крови. По величине диуреза можно судить о наличии избыточного выделения (полиурия), уменьшенного выделения (олигурия) или прекращения выделения мочи (анурия) и переходных состояний мочеобразования, свойственных токсической патологии почек.

Научные исследования показали, что для получения репрезентативных данных необходим сбор 18 или 24-часовой мочи у крыс [80, 346]. Суточную мочу крыс собирали в метаболических клетках фирмы Tecniplast Gazzada S.R.L. Trademarks (Италия) с добавлением в качестве ингибитора протеолиза консерванта, содержащего комбинацию хлорметил- и метилизотиазолинона (5 мкл ProClin-300 на 10 мл мочи). В лабораторных записях регистрировали: номер животного, его массу тела (г), объем собранной мочи (мл). В случае, если сбор мочи осуществляли за 16-18 часов, то проводили пересчет количества мочи, выделяемой за 24 часа по простой пропорции. Расчет суточного диуреза проводили по формуле: $D \text{ (мл/сут/кг массы тела)} = (\text{объем мочи за 24 часа, мл/масса тела, г}) \times 1000 \text{ г}$. Применение данной формулы позволяет уменьшить степень внутригрупповой дисперсии за счёт межиндивидуальных колебаний суточного объема мочи у грызунов, и сделать величину диуреза более стандартизированной, отнесенной к единице массы тела и времени.

Клиренс эндогенного креатинина вычисляли по соотношению концентраций креатинина в суточной моче, собранной за точный период времени, и сыворотке крови [65, 93, 101, 416, 540]. Уменьшение осмотического концентрирования мочи оценивали по концентрационному индексу осмолярности (КИ осм). Величину максимальной реабсорбции осмотически свободной воды (TcH_2O) вычисляли как разность между осмотическим клиренсом и скоростью диуреза [51, 66, 79]. Транстубулярный калиевый градиент (ТТКГ) вычисляли по уравнению Митчелла

Л. Гальперина [212, 274, 275]. Все результаты сопоставляли с данными о нормальных значениях показателей в научных литературных источниках [65, 80, 93, 416, 526, 573].

2.2.4 Проведение перитонеального диализа (ПД)

Фармакодинамическую активность гидрокарбоната натрия – антидота урана [20, 453] в остром эксперименте проверяли при внутривенном введении крысам самцам в течение 3 дней 4% гидрокарбоната натрия (антидот) в эффективной дозе 15 мл/кг после однократного введения уранил ацетата ($1 \times LD_{50}$). Для проведения ПД [386] приготавливали стандартный раствор (А), содержащий стерильные фармакопейные субстанции: глюкозы моногидрат, калия хлорид, натрия хлорид, натрия ацетат тригидрат (осмолярность 395 мОсм/л), и раствор (Б), содержащий, помимо вышеуказанных компонентов, в качестве комплексообразователя субстанцию натрия гидрокарбоната (Медполимер фирма, ПФК АО). Растворы готовили в асептических условиях на апиrogenной воде для инъекций. Для опытных серий растворов проводили физико-химическое исследование сходимости результатов с потенциометрическим измерением уровня рН (ед.), кондуктометрическим определением электропроводности ЕС (мкСм/см) и общего содержания TDS (ppm = мг/л) (Hanna Instruments).

Для моделирования ОПП животных за 10 ч лишали корма и вводили однократно раствор УАД. Наркотизированным животным растворы А и Б вливали (V_{in}) в брюшное пространство правого нижнего квадрата через иглу N25G и силиконовый гепаринизированный катетер с двумя полиэфирными манжетами по системе термостата с температурой $+38^{\circ}\text{C}$ (Shellab) с помощью перистальтического насоса Pharmacia (Uppsala) со скоростью 2 мл/мин в эффективном объеме 100 мл/кг [145] и времени экспозиции 40 минут (каждый сеанс) с последующим обратным сливанием через насос в ёмкости для сбора диализата (V_{ex}) (Рисунок 7). Объёмы измеряли. Процедуру ПД проводили в «остром» режиме в течение 5 часов подряд [386]. Каждая крыса получала суммарно 6 заполнений брюшного пространства и 6 сливов ультрафильтрата. Величину относительной ультрафильтрации вычисляли по соотношению объёмов V_{ex} к V_{in} по каждому сеансу, а затем строили графики линейной регрессии.



Рисунок 7 – Оборудование для проведения экспериментального перитонеального диализа.

Концентрацию изотопа [^{238}U] определяли в суммарном перитонеальном диализате и рассчитывали перитонеальный клиренс урана ($\text{PCl}[^{238}\text{U}]$) в мкг за 6 сеансов диализа методом как для анализа мочи на уран (раздел 2.2.6). С целью проведения биохимических исследований у этих же животных в крови до начала диализа и после 6-го сеанса диализа, а также на 3-е и 7-е сутки наблюдения и перитонеальном диализате определяли мочевины на анализаторе Keulab [354]. Рассчитывали Kt/V и URR (доля снижения уровня мочевины, %) для оценки адекватности диализа [60, 114, 322, 373].

2.2.5 Фармакологические методы

Фармакодинамические свойства препаратов изучали в культуре клеток MDCK и на лабораторных животных [65, 416]. Применяли следующие препараты (ГЛФ) и фармацевтические субстанции (ФС): валсартан (ФС), доксазозин (ФС), допамина гидрохлорид (ФС), индапамид (ФС), карведилол (ФС), нитрендипин (ФС), пропранолол (ФС), унитиол (ФС), сукцинат метилглюкамина-натрия (ГЛФ), сулодексид (ГЛФ), торасемид (ФС), триметазидин (ФС), тригидрокситрансстильбен (ресвератрол, ФС), тетрагидроксиглюкопиранозилксантен (мангиферин, ГЛФ), фумарат натрия (конфумин, ГЛФ), экстракт артишока (хофитол, ГЛФ, Роза-Фитофарма), экстракт золотарника, берёзы, стальника и хвоща (нефрозолид, ГЛФ, соотношение компонентов – 69:18:7:6%, Др. А. Фёгель), экстракт золототысячника, любистока и розмарина (канефрон Н, ГЛФ, экстракт ВНО 1040, соотношение компонентов – поровну, Бионорика СЕ), гранулят композиции экстрактов золотарника, репешка и череды (ГКЭ,

соотношение компонентов – 66:27:7%, содержание сапонинов 2,5%, флавоноидов – 0,5%, СПГХФУ). Нитрендипин (0,5 мг/кг), мангиферин (200 мг/кг), ресвератрол (400 мг/кг), индапамид (2,5 мг/кг), торасемид (10 мг/кг) и конфумин (3,5 мг/кг) вводили в/б крысам за 1 час до сулемы (2 мг/кг на физиологическом растворе натрия хлорида) в профилактической схеме. Животные были помещены в метаболические клетки для сбора мочи, а затем подвергнуты плановой эвтаназии через 24 часа после индукции ОПП. В крови оценивали уровень креатинина, а в моче нормализованное отношение липокалина-2 к креатинину.

Фумарат-опосредованную защиту ренальной ткани изучали на модели тепловой ишемии почки (ТИП) на кроликах-самцах породы Советская шиншилла. Модель интраоперационной ТИП создавали наложением сосудистого зажима на почечную артерию длительностью 30 и 60 минут [61]. После взятия образцов кровотоков по артерии восстанавливали. Конфумин вводили в дозе 1,5 мг/кг внутривенно за 24 и 2 часа до операции. В сыворотке крови измеряли уровень липокалина-2, креатинина и продуктов ПОЛ.

Коррекцию нарушений КОС проводили на модели отравления ЭГ в дозе 6 мг/кг однократно в/ж. В качестве конкурентного ингибитора алкогольдегидрогеназы животным вводили этанол в виде 30% раствора в дозе 2 мг/кг в/б через 1, 4, 6, 12, 18 ч после отравления по схеме, обеспечивающей его концентрацию в крови не менее 25 ммоль/л [13, 57]. Ацидоз корректировали введением 4% раствора натрия гидрокарбоната в дозе 6 мг/кг три раза в/б в первые сутки после отравления. ДМФ, 15% раствор (ОАО «Татхимфармпрепараты»), разбавляли стерильным апиrogenным изотоническим раствором натрия хлорида в четыре раза и вводили в дозе 150 мг/кг в/б с интервалом 3 ч в первые сутки после отравления (450 мг/кг в сутки в объёме 0,40 мл/100 г массы тела). Эффективность коррекции оценивали по биохимическим показателям, характеризующих метаболический ацидоз и функции почек.

2.2.6 Химико-токсикологические методы

Химико-токсикологический анализ нефротоксинов проводили путём качественного обнаружения (цветные реакции с резорцином в щелочной среде на хлорорганические соединения, с другими реактивами, методом тонкослойной хроматографии) и количественного инструментального анализа в биоматериале отравленных животных, а также в извлечениях из грибов после жидкость-жидкостной экстракции. Измерения концентрации урана [²³⁸U] проводили на масс-спектрометре с ионизацией в индуктивно-связанной плазме ELEMENT 2 HR-ICP-MS (Thermo Fisher Scientific) (с к.х.н. Н.Б. Иваненко) [30]. Обзорный анализ состава летучих веществ проводили в равновесной парогазовой смеси над поверхностью нагретой

биожидакости без внесения внутреннего стандарта методом газовой хроматографии с масс-детектором (ГХ-МС). Определение 1,2-дихлорэтана в моче проводили методом газожидкостной хроматографии с детектором электронного захвата (ГЖХ-ДЭЗ) на приборе «Хроматэк-Кристалл 5000.2» по абсолютной калибровке (с к.х.н. Г.Н. Кульбицким) [15, 67]. Этиленгликоль определяли после дериватизации на газовом хроматографе с масс-селективным детектором GCMS-QP2010Plus (Shimadzu) с использованием пропилен-1,3-гликоля в качестве внутреннего стандарта (с к.х.н. И.К. Журкович). Орелланин определяли хромато-спектрофотометрическим методом, а альфа-аманитин – методом иммуноферментного анализа (набор AMANITIN ELISA, Bühlmann Lab. AG) на спектрофотометре Synergy2 и EPOCH2 (BioTek Instruments Inc.).

Методика определения этиленгликоля (ЭГ) в биожидакостях ГХ-МС с дериватизацией. Дериватизация проводилась непосредственно в разбавленном водно-ацетонитрильном растворе сразу после стадии осаждения белков. 1 мл крови или мочи центрифугировали при $1500 \times g$ в течение 15 минут. Для осаждения белков плазмы крови к 300 мкл супернатанта добавляли 600 мкл ацетонитрила, содержащего внутренний стандарт 1,2-пропандиол в концентрации 0,15 мг/мл, тщательно перемешивали и повторно центрифугировали в течение 3 минут при $10000 \times g$. 30 мкл надосадочного слоя переносили в виалу, добавляли 100 мкл N,O-бис-(триметилсилил)-ацетамид (BSA) и термостатировали в течение 1 минуты при $+80^\circ\text{C}$. После охлаждения пробы разбавляли 0,5 мл дихлорметана и вводили по 1 мкл в колонку хроматографа. Условия хроматографирования: газовый хроматограф с масс-селективным детектором GCMS-QP2010Plus (Shimadzu); колонка Equity-5 30 м, диаметр 0,25 мм, толщина слоя 0,25 мкм; газ носитель – гелий, 1 мл/мин; деление потока 1:15; температура испарителя $+280^\circ\text{C}$; температура источника $+200^\circ\text{C}$; температура интерфейса $+200^\circ\text{C}$; режим программирования температуры: 50 (5) – 10 – 100 (0) – 50 – 280 (1,5); режим мониторинга по ионам: основной – 147 и вспомогательный – 191 (ЭГ), а также 130 (ПГ – внутренний стандарт). Идентификацию проводили сначала по масс-спектрам соединений, в дальнейшем – по времени удерживания. Оценка методики по параметрам линейности, специфичности и селективности, правильности и воспроизводимости показала её соответствие основным международным критериям, предъявляемым к характеристикам методик анализа биологических образцов (с к.х.н. И.К. Журкович) [15, 67].

Методика определения дихлорэтана (ДХЭ). Определение 1,2-дихлорэтана в моче проводили методом газожидкостной хроматографии с детектором электронного захвата (ГЖХ-ДЭЗ) на приборе «Хроматэк-Кристалл 5000.2» с программным обеспечением «Хроматэк-Аналитик» [15, 67]. Для этого аликвоту 2,00 мл мочи животных, отравленных ДХЭ, помещали в герметичный контейнер и нагревали до $+60^\circ\text{C}$, после чего отбирали паровую фазу пробы и

вводили микрошприцем в газовый хроматограф. Среднеквадратическое отклонение по ДЭЗ составляло менее 4%.

Методика определения урана. Подготовка проб к разложению состояла из следующих операций: 0,50 мл тщательно перемешанного образца мочи помещали в вialу для разложения, добавляли 2 мл концентрированной азотной кислоты, 6 мл деионизованной воды и разлагали в течение 30 минут по температурно-временной программе, представленной в таблице 7, в СВЧ минерализаторе Start D (Milestone). Охлаждение минерализованных проб составляло 30 минут. Далее минерализат помещали в колбу на 50 мл, доводили до метки деионизованной водой и тщательно перемешивали. Содержание изотопа [^{238}U] урана в пробах мочи определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой [30, 211, 577]. Преимущество масс-спектрометра высокого разрешения с секторным полем заключается в способности физически отличать и отделять аналит [^{238}U] от помех путём использования небольших различий в массе-заряде (m/z) (Рисунок 8). Газ-носитель и плазмообразователь: аргон высшей степени чистоты. Скорость впрыскивания пробы в распылитель: 1 л/мин. Измерения проводили на масс-спектрометре ELEMENT 2 HR-ICP-MS (Thermo Fisher Scientific, Германия) при следующих параметрах плазмы: скорость охлаждающего газа 16,4 мл/мин; скорость плазмообразующего газа 0,73 мл/мин; скорость транспортирующего газа 0,905 мл/мин; мощность ВЧ генератора – 980 Вт. Для построения градуировочных зависимостей в распылительную камеру подавались градуировочные водные растворы с концентрацией урана 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 и 10 мкг/л. Аналитический минимум (предел обнаружения) для [^{238}U] составил 1 нг/л. Линейность в диапазоне от предела обнаружения до 1 мг/л.

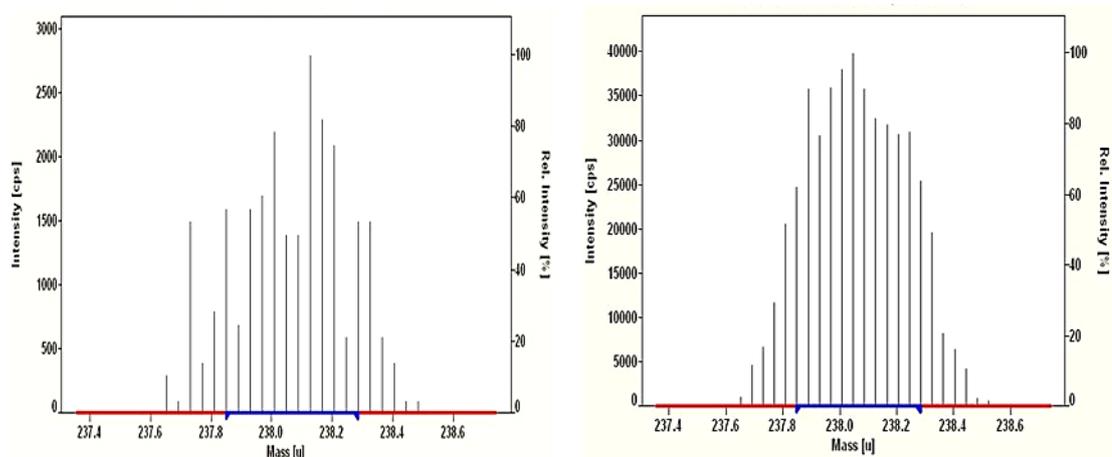


Рисунок 8 – Масс-спектр изотопа [^{238}U] урана в моче интактных крыс (слева) и крыс из опытной группы (справа).

Для проб опытных крыс с высоким содержанием урана было использовано низкое разрешение прибора для изотопа [^{238}U] урана [30]. Правильность полученных результатов проверяли с использованием Seronorm Trace Elements U № 201205 (Норвегия).

Методика определения орелланина. Орелланин и продукты его биodeградации не могут быть обнаружены в моче и диализных жидкостях, так как большая часть токсина концентрируется в ткани почек [92, 139, 149, 437, 482, 499, 500, 505]. Концентрирование в почках обусловлено реабсорбцией токсина в проксимальных канальцах и его прочным связыванием с белками почек [505]. Орелланин качественно выявляется в небольших количествах в почечной ткани в течение относительно длительного периода после отравления. Навеску измельчённой ткани почки 100 мг (точная навеска) помещали в 1,5 мл пробирку Эппендорфа и добавляли 400 мкл 50% раствора метанола с добавлением 3 М соляной кислоты (10:1, об/об) и диспергировали в УЗ-ванне в течение 5 минут при температуре +40°C в темноте. Затем пробы центрифугировали при 10000×g в течение 5 минут. Отбирали по 50 мкл супернатанта, который упаривали и наносили на пластины силикагеля ПТСХ-П-В Sorbfil (ТУ 4215-002-43636866-2007), затем пятна высушивали в токе холодного воздуха в течение 1 минуты. В качестве свидетеля наносили 10 мкл жидкого спиртового аутентичного экстракта (1:2) из плодовых тел грибов *Cortinarius spp. (orellanus/speciosissimus)*. Для удаления липидов пластину дважды прогоняли в системе гептан и высушивали, при этом липиды перемещались от старта к линии фронта. Пластины с нанесёнными образцами после отделения липидов помещали в вертикальную камеру, насыщенную 1 час парами систем растворителей: 1) бутанол-1 – уксусная кислота – вода (3:1:1); 2) изопропанол – этилацетат – вода (4:3:3), длина пробега системы 6-8 см [149, 338, 347]. После разделения пластинку высушивали в токе воздуха и просматривали в УФ-свете с длиной волны 365 нм. Орелланин и его метаболиты проявлялись в УФ-свете в виде жёлтого и светло-голубых пятен. При продувании пластины в токе горячего воздуха отмечали частичное окисление орелланина и пятна принимали лимонно-жёлтую окраску в видимом свете. Проявление пластин проводили с помощью реактива Шумахера (0,5% спиртового раствора хлорида железа (III) – серо-синие пятна) и реактива Фолина (раствора смеси фосфорно-молибденовой и фосфорновольфрамовой кислот – темно синие пятна). Дополнительно с пластин после просмотра в УФ-свете соскребали слой силикагеля с зонами токсина в 1,5 мл пробирку Эппендорфа и добавляли 700 мкл 50% раствора метанола, перемешивали и центрифугировали при 10000×g в течение 5 минут. Супернатант в объёме 500 мкл переносили в кварцевую полумикрокювету и снимали спектр поглощения в диапазоне длин волн 200-450 нм с интервалом в 1 нм на спектрофотометре EPOCH2 (BioTek Instruments Inc., США). Максимумы абсорбции орелланина находились на длинах волн 215-230,

278-288, 340-350 нм. Величина молярного коэффициента поглощения орелланина, имеющего характерные экстремумы в спектре поглощения, при 288 нм составляла $\epsilon = 9100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Методика определения аманитина. α -Аманитин является основным термостабильным токсином чрезвычайно ядовитых грибов *Amanita phalloides* (бледная поганка), *Amanita verna*, *Amanita virosa* и других видов мухоморов [121, 122]. Эти грибы также содержат другие аматоксины, такие как β - и γ -аманитины, а также фаллотоксины. Аматоксины обнаружены в *Galerina marginata* (*Pholiota marginata*), *Galerina autumnalis*, *Galerina sulciceps* и других видах *Galerina* и *Lepiota*. Для определения альфа-аманитина исследовали сыворотку крови и мочу отравленных животных, а также 5-кратные гомогенаты внутренних органов (1:5, печени и почек) на 5% растворе калия хлорида, которые для инактивации эндогенной пероксидазы обрабатывали в герметичных пробирках в СВЧ-печи 30 секунд при мощности 800 Вт, а затем центрифугировали при $10000 \times g$ в течение 5 минут. Количественное определение проводили методом иммуноферментного анализа с помощью EK-AM1 Amanitin ELISA Kit (Bühlmann, Швейцария; Bühlmann Laboratories. Amanitin ELISA, instruction manual. Bühlmann Laboratories AG, CH-Allschwil, 2000. 24 p.). После добавления кислого стоп-раствора цвет менялся с синего на жёлтый и был измерен при 450 (основная длина волны) и 630 нм (дифференциальная длина волны) на спектрофотометре Synergy2 и EPOCH2 (BioTek Instruments Inc., США). Калибровочную кривую строили по осям относительной величины разности абсорбций (450-630 нм) и концентрации. Рассчитывали привязку (В) каждой пары калибровочных лунок в процентах от нулевого калибратора (B_0) с поправкой на оптическую плотность нулевого калибратора, которая была принята за 100% – B/B_0 . Для внутрисерийного контроля качества исследовали уровень альфа-аманитина в контрольных образцах с низким (2,6 нг/мл, CV<6%) и высоким (52,9 нг/мл, CV<7%) содержанием. Дискриминационный уровень cut-off, выше значения которого были расположены все положительные образцы с аманитином, составил 1,5 нг/мл для мочи. Аналитические параметры методики: определяемый диапазон 0,22-100,00 нг/мл, чувствительность аналитическая 0,22 нг/мл, функциональная – 1,5 нг/мл, специфичность – альфа-аманитин 100%, бета-аманитин 0,1%, гамма-аманитин 90%, эпсилон-аманитин 0,1%, фаллоидин и фаллацидин не определяются; прецизионность внутрисерийная менее 7%, межсерийная – менее 8%, сохранение линейности при разбавлении (от 1:25 до 1:800) 97,8% (моча), правильность в методе добавок составила 99,9% (моча) и 104-111% (сыворотка, плазма крови). Вычисляли коэффициенты логистической функции и уравнение 4-х параметровой логистической функции по методу наименьших квадратов, строили калибровочный график.

Методика определения сульфаниламидов. Качественное обнаружение сульфаниламидных препаратов (САФ) проводили методом поляризационной микроскопии осадка мочи (N-ацил-сульфанилариламины) и методом тонкослойной хроматографии после

жидкость-жидкостной экстракции из 2 мл мочи в 10 мл этилацетата (дважды порциями по 5 мл по 5 минут). Органическую фазу выпаривали в химических стаканчиках до 1 мл и наносили на стартовую линию пластин силикагеля ПТСХ-П-В Sorbfil (ТУ 4215-002-43636866-2007). В качестве свидетеля наносили 10 мкл растворов «свидетелей» сульфаниловой кислоты и котримаксазола. Пластины с нанесёнными образцами помещали в вертикальную камеру, насыщенную парами системы растворителей бутанол-1 – хлороформ (1:4). Длина пробега растворителя – 6-8 см. После разделения пластинку высушивали и опрыскивали 0,01% раствором флуорескамина в ацетоне и нагревали до +80°C. В местах локализации сульфаниламидов проявлялись жёлтые пятна, флуоресцирующие при 365 нм.

Метод количественного определения САФ основан на реакции Брэттона-Маршалла с ароматическими аминами. Сульфаниламиды, находящиеся в растворенном виде в моче, вступают в реакцию диазотирования с нитритом натрия в кислой среде, затем соль диазония азосочетают с 1-нафтил-этилендиамином. Полученный продукт реакции измеряют количественно методом фотометрии. Образцы мочи центрифугировали при 400×g в течение 5 минут. Для определения сульфаниламидных лекарственных препаратов использовали супернатант. Аликвоту мочи и стандартного раствора калибратора в объёме 1 мл помещали в пробирку Эппендорфа, добавляли с помощью дозатора 50 мкл 0,2% раствора нитрита натрия, перемешивали, добавляли 50 мкл 30% раствора муравьиной кислоты, снова перемешивали и оставляли на 1 мин для протекания 1 стадии реакции (диазотирования). Добавляли к продукту 1 стадии реакции с помощью дозатора 50 мкл денитрирующего раствора сульфаминовой кислоты, а затем 150 мкл 0,1% раствора 1-нафтил-этилендиамина гидрохлорида для протекания 2 стадии реакции (азосочетания). При наличии в моче сульфаниламидов появлялось розовое или фиолетово-красное окрашивание. Через 5 минут проводили измерение абсорбции при 540 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против контрольной пробы на реактивы и распечатывание результата. Результат выражали в виде мг/дл мочи. Абсорбция 0,5 мг/дл раствора калибратора сульфаниловой кислоты должна находиться в диапазоне 0,95-1,0 ед. оптической плотности против контрольной пробы на реактивы (вместо мочи или калибратора используют 1,00 мл воды очищенной, далее – по методике). Фактор пересчёта составляет 0,51-0,54. Коэффициент вариации внутри серии из 20 повторных измерений составил 4,6%. Открываемый минимум 0,004 мг/дл.

2.2.7 Физико-химические методы исследования мочи

Физическое исследование суточной мочи животных проводили путём измерения плотности, электропроводности (ЕС) и общего содержания [93, 101, 155, 218, 312, 327, 419, 440].

Оценка плотности и содержания. Для измерения плотности мочу подогревали до температуры $+20^{\circ}\text{C}$ и в объёме 0,2 мл наносили на призму цифрового рефрактометра, а электропроводность (ЕС, $\text{мкСм}/\text{см}^2$) и суммарный уровень растворимых солей (TDS, мг/л) измеряли методом кондуктометрии разбавленных 1:10 дистиллированной водой образцов мочи. Концентрацию солей вычисляли с учётом разбавления проб в 10 раз и выражали в мг/л. Для пересчёта показателя преломления мочи при температуре $+20^{\circ}\text{C}$ в величину плотности (г/мл) использовали уравнение линейной регрессии ($R^2=0,9942$): $S.G. = (3,9966 \times RI) - 4,326$, г/мл. Для расчёта общего солевыделения (ОСВ, мг/сут/кг) применяли уравнение ($R^2=0,9361$): $\text{ОСВ} = \text{Суточный диурез (мл/кг/сут)} \times (\text{TDS}/1000)$.

Оценка осмоляльности мочи. Осмоляльность мочи и плазмы крови оценивали на автоматическом криоскопическом осмометре OSMOMAT 030 (Gonotec, Германия). Осмоляльность мочи по плотности рассчитывали по уравнению $U_{\text{Osm}} = (33701 \times S.G.) - 33662$, где S.G. плотность мочи (г/мл), измеренная рефрактометрически и выражали в мОсм/кг. Концентрационный индекс по осмолярности (КИ осм) вычисляли по соотношению осмолярности мочи и осмолярности плазмы крови [66, 312].

2.2.8 Методы микроскопического исследования мочевых осадков

Автоматический скрининговый подсчет числа клеток, цилиндров и солей нативной мочи проводили на анализаторе Fluidlab1 Vet (Anvajo/Диакон-Вет) с использованием стекол-камер Acella100 (Anvajo/Диакон-Вет). Клетки дифференцировали по их форме, размеру и гранулярности.

Пробоподготовка мочи для ручного микроскопического исследования включала в себя центрифугирование при $400 \times g$ в течение 5 минут 2 мл суточной мочи животных, декантирование супернатанта, взмучивание осадка и фиксация клеток в 1,5 мл фиксирующего раствора в течение 10 минут и повторного центрифугирования. В осадке оставались цилиндры и клетки, подготовленные к окрашиванию суправитальным красителем.

Микроскопическое исследование мочевых осадков проводили в слайд-планшете АРТАСА и KOVA [93, 196, 539]. Клетки мочевого осадка окрашивали красителем Штернхаймера, дифференцировали по их форме, размеру и гранулярности на клетки плоского,

переходного и почечного эпителия, лейкоциты, эритроциты для подтверждения токсической нефропатии [461, 470, 471].

Подсчёт форменных элементов проводили согласно инструкции к применению каждого типа слайд-планшета. Вычисление количества форменных элементов в моче при применении 5-сеточного слайд-планшета АРТАСА проводили по формуле: $N = A \times 0,2$, где N – количество клеток в 1 мкл мочи, A – число клеток, подсчитанных в 5 больших квадратах камеры слайд-планшета, 0,2 – количество мочи, оставленное с осадком для микроскопии (мл). При наличии 1 цилиндра считали цилиндры при увеличении микроскопа 200× по всему карману слайд-планшета. Полученные значения округляли до целого числа.

Для отмывки осадка от солей был разработан и применён фиксирующий-отмывающий раствор, содержащий: натрия хлорид 4%, лимонная кислота 0,5%, натрия цитрат 1%, натрия эдетат 0,2%, формальдегид 0,4-1,0%, pH = 6,0 (по pH-метру). Состав раствора соответствовал плотности нативной мочи крыс, что позволяло сохранять форму клеток осадка, а входящие компоненты обеспечивали фиксацию клеток в жидкой среде, перфорацию мембраны клеток для проникновения красителей с целью типирования клеток.

2.2.9 Методы молекулярно-биологического исследования

Диализ мочи. С целью удаления низкомолекулярных ингибиторов ферментов (мочевина, соли и т.д.), присутствующих в конечной моче животных, использовали физико-химический метод диализа. В процессе взаимодействия с диализной мембраной низкомолекулярные вещества, ограниченные молекулярной массой не более 3500 г/моль, переходят по градиенту концентраций из мочи в диализирующий раствор фосфатного буфера, а белки с молекулярной массой больше 4 кДа остаются в моче. Для проведения диализа суточную мочу в трипликатах помещали в диализные пробирки D-Tube Dialyzer Maxi MWCO 3,5 kDa (Novagen/Merck/Millipore) в объёме 2 мл, закрывали крышкой и помещали на плавающей полиуретановой подушке в стакан с: а) 800 мл фосфатного буфера (1,6 г/л дигидрофосфата калия, 20,7 г/л гидрофосфата калия тригидрата, pH 7,4) на 2 часа или б) 1000 мл дистиллированной воды на 5 часов согласно принятому протоколу диализа (http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/dialysis/MILLIPORE_SampleDialysis). Стакан с пробями устанавливали в холодильнике при +4-8°C на магнитную мешалку при скорости вращения магнитного якоря 200 об/мин в течение необходимого времени. Контроль эффективности диализа оценивали по электропроводности (ЕС, мкСм/см) в моче до и после диализа. Далее, по

завершении диализа, мочу переносили в микропробирки для последующего ферментативного анализа.

Концентрирование белков мочи методом ультрафильтрации. Для концентрирования белков мочу в объёме по 500 мкл наносили на патрон-колонку с фильтром-концентратором молекулярных масс на 10 и 50 кДа Microcon® Centrifugal Filter Devices фирмы Amicon (Millipore Corporation). Патрон-колонка содержит мембранный фильтр Ultracel YM-10/50 из регенерированной целлюлозы со слабой связью. Патрон взвешивали и помещали в центрифужную микропробирку-приёмник для центрифугирования, которое проводили при скорости вращения фиксированного углового ротора $10000 \times g$ в течение 20 минут. Далее патрон-колонку вынимали из микропробирок и взвешивали. Рассчитывали степень концентрирования образцов по соотношению масс до и после центрифугирования. Затем патрон-колонку переворачивали и снова центрифугировали 1 мин в новую микропробирку-приёмник. Собранные концентраты белков мочи использовали для анализа на ферментативную активность, а также электрофоретического разделения и идентификации белков.

Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) и масс-спектрометрическая идентификация белков мочи. Образцы нативной мочи по 5 мкл смешивали с буфером Лэммли и проводили термическую денатурацию в присутствии бета-меркаптоэтанола. Образцы в объёме 10 мкл наносили в лунки полиакриламидного геля (ПААГ, градиент 6-18%). Электрофоретическое разделение белков проводили в ячейке «Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis» с использованием маркеров молекулярных масс в каждом разделении. Для оценки воспроизводимости проводили внутри- и межсерийную оценку коэффициента вариации при разделении в 8 повторностях образцов мочи. Гели окрашивали коллоидным раствором Coomassie Brilliant Blue G-250 (чувствительность 1,0 нг белка на полосу/бэнд), получали изображения и проводили денситометрический анализ в программах документирования гелей ChemiDoc MP System, GelDoc EZ (BioRad, США). Для идентификации, выбранные окрашенные зоны ПААГ вырезали, фрагмент геля восстанавливали дитиотреитолом (ДТТ), алкилировали йодацетамидом и расщепляли трипсином. Образцы смешивали с матрицей НССА – α -циано-4-гидроксикоричной кислотой (Bruker, 5 мг/мл в 50% ацетонитриле с 0,1% трифторуксусной кислоты), наносили на мишень «GroundSteel» и высушивали. Спектры триптических пептидов регистрировали на тандемном времяпролетном масс-спектрометре с матричной лазерной десорбцией и ионизацией MALDI-TOF/TOF «ultrafleXtreme» (Bruker, Германия) в отделе молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (с к.ф.-м.н. Забродская Я.А., рук. А.В. Васин). На каждый масс-спектр суммировали 3000 импульсов лазера. Идентификацию белков проводили в программе «Biotools» с использованием MASCOT (matrixscience.com) при обращении к базам

данных NCBI (ncbi.nlm.nih.gov) и SwissProt (uniprot.org). Погрешность ограничивали 20 ppm. Идентификацию считали достоверной в случае, если величина Score превышала пороговое значение ($p < 0,05$).

2.2.10 Биохимический анализ крови, мочи и ткани почек

Кровь получали путём венепункции и из сердца при проведении плановой эвтаназии. Сыворотку крови получали после полной коагуляции с активатором свёртывания через 15-20 мин после взятия образцов. В образцах сыворотки крови определяли величину pH (методом ISE), уровень натрия (методом ISE), калия (методом ISE), кальция (методом ISE), магния (Thermo Scientific), хлоридов (методом ISE), гидрокарбонатов (DiaSys), лактата (DiaSys), d-3-гидроксипутирата (Randox), альбумина (Randox), мочевины (Randox) и креатинина (Вектор Бест) [258], продуктов глубокого окисления белков AOPP [170, 371, 450, 591, 592] на автоматическом биохимическом анализаторе KeyLab (BPC+Biosed s.r.l., Италия) и анализаторе электролитов E-Lyte (HTC, США) [65, 96, 266, 510]. Концентрационный индекс по креатинину (КИ) рассчитывали, как отношение уровня креатинина в моче к таковому в сыворотке крови. Вычисляли анионную разницу ($AG, AP = Na - (Cl + HCO_3)$), ΔpH , ΔAG , ΔHCO_3 , $\Delta AG/\Delta HCO_3$, ΔGap (расчётные параметры) [86, 231, 342, 343, 363, 593]. Вычисления проводили по уравнениям, адаптированным для животных: $\Delta pH = 7,4 - pH$, $\Delta AG = AG - 10$, $\Delta HCO_3 = 30 - HCO_3$, $\Delta Gap = \Delta AG - \Delta HCO_3$.

Расчет URR (доли снижения уровня мочевины, %) проводили по уравнению $URR = (1 - U_{r_{post}}/U_{r_{pre}}) \times 100\%$, где $U_{r_{pre}}$ концентрация мочевины в крови до начала диализа, $U_{r_{post}}$ концентрация мочевины в крови после диализа [114, 322, 373].

В рамках общеклинического исследования мочи животных при введении им нефротоксикантов определяли профиль изменений в составе мочи [138] с помощью тест-полосок [183, 507], а положительные результаты подтверждали с помощью биохимического исследования [93, 349, 416] на Synergy2 и EPOCH2 (BioTek Instruments Inc.), URiСКАН-БК [1], АБхФк-02 БиАн, KeyLab.

Гомогенаты почек готовили на охлаждённом до 0°C 5% хлориде калия в гомогенизаторе Эвелина-Поттера в соотношении 1:10 при вращении пестика до полной деструкции ткани (коркового и мозгового слоёв, без капсулы). Затем гомогенаты центрифугировали при $10000 \times g$ 5 мин, отбирали супернатант из середины слоя. Плазму и сыворотку крови получали после центрифугирования крови при 3500 об/мин в течение 5 минут.

Скрининговый биохимический анализ мочи [93, 394] проводили с помощью анализатора Aution Eleven AE-4020 фирмы Arkray Factory, Inc. (Япония) (Aution Eleven AE-4020 – Semi-automatic Urine Analyzer: Operating Manual. 2005. ARKRAY, Inc., Japan): определяли цвет, pH, уровень белка, глюкозу, уробилиноген, билирубин, кетоны и нитриты с помощью тест-полосок Aution Sticks 10EA и 10PA [138, 183, 475, 507]. Все положительные по глюкозе, белку, лейкоцитам, эритроцитам и pH пробы исследовали более детально аналитическими методами биохимии и микроскопическим методом.

Концентрацию белка и креатинина (мг/дл) [1, 156] определяли на анализаторе URiСКАН-БК в пробирках из боросиликатного стекла (Awareness Technology Inc., США). Для анализа использовали 20 (белок) и 10 мкл (креатинин) пробы мочи, исследование выполняли в дубликатах. Определение концентрации общего белка в моче проводили методом связывания пирогаллолового красного с помощью набора реактивов Юни-Тест-БМ (ТУ 9398-001-59879815-2004, ООО Эйлтон). Принцип измерения концентрации белка в моче основан на взаимодействии молекул белков с молибдатом красителя пирогаллолового красного и регистрации дифференциальной оптической плотности на длинах волн 589 (основная) и 660 нм (дифференциальная). Диапазон измерения концентрации белка 0-8,0 г/л с погрешностью: 10% для диапазона концентраций 0,04-0,30 г/л, 8% для диапазона 0,3-1,0 г/л и 4% для диапазона 1,0-8,0 г/л. Определение концентрации креатинина в моче (г/л) проводили методом Яффе с помощью набора реактивов Креатинин-UTS (ТУ 9398-001-59879815-2009, ООО Эйлтон). Принцип измерения концентрации креатинина в моче основан на взаимодействии молекул креатинина с щелочным раствором пикриновой кислоты и регистрации дифференциальной оптической плотности на длинах волн 525 (основная) и 625 нм (дифференциальная). Диапазон измерения концентрации креатинина 0-10,0 г/л с погрешностью: 10% для диапазона концентраций 0,10-0,40 г/л, 4% для диапазона 0,4-1,0 г/л и 1,2% для диапазона 1,0-10,0 г/л. Соотношение белок/креатинин (P/C-Ratio) [1, 156, 257] проводили расчётным методом автоматически согласно инструкции к анализатору, а все результаты распечатывались в форме протокола на термобумаге [1].

Определение ферментов мочи. В ткани почек грызунов наибольшей активностью обладают гамма-глутамилтрансфераза, бета-N-ацетилглюкозаминидаза, аланинаминопептидаза и щелочная фосфатаза. Нефроносцифичность ферментов обусловлена их происхождением преимущественно из проксимальных или дистальных канальцев [65, 128, 190, 205, 278, 287]. Для определения ферментов в моче используют образцы после их разбавления в 10 раз или после диализа. Биохимические исследования проводили на автоматическом биохимическом анализаторе KeyLab фирмы BPC+Biosed (Италия) с использованием наборов для

биохимического определения показателей фирмы Analyticon (Германия) и Randox (Великобритания).

Определение активности гамма-глутамилтрансферазы (ГТФ) [189, 333-335, 350, 381, 445]. Активность определяли по реакции мочи с субстратом карбокси-глутамил-4-нитроанилидом в щелочном буфере с регистрацией динамики нарастания абсорбции при 405 нм с помощью набора GGT (Randox). Активность фермента выражали в Е/л и соотносили с уровнем креатинина в моче (мг/дл). Для исследования применяли только свежесобранные образцы, не подвергавшиеся замораживанию.

Определение активности щелочной фосфатазы (ЩФ) [65, 93, 416, 445]. Активность определяли по реакции мочи с субстратом 4-нитрофенилфосфатом в щелочном АМП-буфере с регистрацией динамики нарастания абсорбции при 405 нм с помощью набора ALP IFCC (Randox). Активность фермента выражали в Е/л и соотносили с уровнем креатинина в моче (мг/дл). Фермент стабилен в моче.

Определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [65, 93, 416, 444]. Активность определяли по реакции мочи с субстратом лактатом в буфере с регистрацией динамики абсорбции при 340 нм с помощью набора LDH-L (Randox). Активность фермента выражали в Е/л и соотносили с уровнем креатинина в моче (мг/дл). Для исследования применяли только свежесобранные образцы, не подвергавшиеся замораживанию.

Определение активности аланинаминопептидазы (АлАП) [65, 93, 289, 416, 492]. Мочу очищали гель-фильтрацией для удаления мешающих примесей. Образцы мочи по 100 мкл помещали в пробирки Microspin G50 Columns (Sigma-Aldrich), центрифугировали при $700 \times g$ в течение 2 мин и использовали для анализа. Активность АлАП определяли по реакции 80 мкл мочи в 400 мкл 60 мМ трис-НСl буфера рН 7,85 с 40 мкл субстрата 26 мМ (0,64%) раствора L-аланил-4-нитроанилида (Sigma-Aldrich) с регистрацией 2-х минутной динамики роста абсорбции при 405 нм на автоматическом биохимическом анализаторе KeyLab (BPC+Biosed) [289]. Активность фермента выражали в Е/л и соотносили с уровнем креатинина в моче (мг/дл). Для исследования применяли только свежесобранные образцы, не подвергавшиеся замораживанию.

Определение активности бета-N-ацетилглюкозаминидазы (НАГ) [351, 416]. Активность определяли с помощью набора β -N-Acetylglucosaminidase Assay Kit CS0780 (Sigma-Aldrich) в 96-луночном планшете по реакции мочи с субстратом 4-нитрофенил-N-ацетил-бета-D-глюкозаминидом в 0,09 М цитратном буфере с регистрацией абсорбции при 405 нм после добавления 4% карбоната натрия. Абсорбцию измеряли на планшетном спектрофотометре EPOCH2 (BioTek Instruments Inc.). Активность фермента выражали в Е/л и соотносили с уровнем креатинина в моче (мг/дл). Фермент стабилен в моче.

Осаждение гликопротеина Тамм-Хорсфалла (уромодулина) из мочи. Для удаления уромодулина из проб по 0,25 мл мочи смешивали с 0,25 мл 1 М (20%) раствора магния хлорида в течение 1 часа, в результате связывания ионов магния уромодулин полимеризовывался и осаждался. Далее пробы центрифугировали при 2000×g в течение 15 минут. Супернатант в объеме 0,20 мл смешивали с 0,20 мл дистиллированной воды и анализировали на содержание гликозаминогликанов (разбавление в 4 раза).

Удаление N-сульфатированных гликозаминогликанов. Для удаления гепаран сульфата из пула N,O-сульфатированных гликозаминогликанов использовали реакцию нитрозирования с последующей денитрацией. Азотистая кислота вступает в реакцию с N-сульфатированным D-глюкозаминном в гепарине и гепаран сульфате путём расщепления аминсахара с образованием 2,5-ангидроманнозного остатка. Для этого к 0,2 мл мочи добавляли 0,2 мл 5% раствора нитрита натрия и 0,2 мл 25% раствора уксусной кислоты в микропробирках Эппендорфа. Пробирки инкубировали с закрытой крышкой 1 час. После этого к пробам добавляли 0,2 мл денитрирующего 12,5% раствора сульфаминовой кислоты в растворе аммиака и определяли O-сульфатированные ГАГ (разбавление в 4 раза) [307].

Определение гликозаминогликанов (ГАГ). Метод прямого количественного определения общего содержания гликозаминогликанов в моче основан на связывании красителя альцианового синего. По 50 мкл мочи, гомогената почек 1:10 или стандартного раствора хондроитин сульфата (100 мкг/мл) смешивали с 1 мл 0,05% раствора альцианового синего 8GX в 50 мМ растворе магния хлорида (1%) на 50 мМ ацетатном буфере с pH 5,8 и оставляли на 2 часа для полноты реакции. Далее пробы центрифугировали при 2000×g в течение 15 минут. Осадок промывали дважды 2 мл 95% этанола и снова центрифугировали, затем растворяли в 1 мл 5% раствора додецилсульфата натрия. Раствор встряхивали до полного растворения осадка и измеряли абсорбцию при 620 нм на спектрофотометре EPOCH2 (BioTek Instruments Inc.) [151, 176, 307, 588].

Определение коллагена. Метод прямого количественного определения коллагена в моче основан на связывании красителя прямого красного № 80 с RGD-последовательностями коллагеновых белков в пробах (130 моль красителя: 1 моль белка) после удаления других белков мочи методом ультрафильтрации. По 100 мкл мочи, гомогената почек 1:10 или стандартного раствора коллагена из кожи быка (100 мкг/мл) смешивали с 1 мл 0,4% раствора прямого красного № 80 в 1% растворе пикриновой кислоты и оставляли на 30 минут для полноты реакции. Далее пробы центрифугировали при 10000×g в течение 10 минут. Осадок промывали 750 мкл холодного кислотного-солевого промывающего реагента и снова центрифугировали, затем растворяли в 250 мкл 0,5 М раствора гидроксида калия в 95% этаноле. Раствор встряхивали до полного растворения осадка и измеряли абсорбцию при 555 нм на

спектрофотометре EPOCH2 (BioTek Instruments Inc.). Молярный коэффициент экстинкции при максимуме поглощения составляет $37600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Линейный диапазон для сохранения закона Бугера-Ламберта-Бера – от 5 до 100 мкг/мл. Чувствительность – 0,5 мкг/мл. [177, 359, 401].

Определение Kim-1. Молекулу повреждения почек Kim-1 определяли в пробах мочи методом иммуноферментного анализа. Для анализа использовали набор для ИФА Kim-1 ELISA Test Kit (BioAssay Works) количественного определения концентрации молекулы-1 повреждения почек (Kim-1) в образцах мочи. Чувствительность – 0,08 нг/мл. Линейный диапазон: 0,15-40 нг/мл. Воспроизводимость: 8%.

Определение липокалина-2 (NGAL). Липокалин-2 определяли методом иммуноферментного анализа с помощью набора Lipocalin-2/NGAL ELISA Kit (BioVendor) (Рис. 14). Используемый в этом наборе NGAL крысы – рекомбинантный белок, состоящий из 177 аминокислот с молекулярной массой 21 кДа. Чувствительность – 0,3 нг/мл. Линейный диапазон: 0,15-10 нг/мл.

Определение ретинол-связывающего белка. Ретинол-связывающий белок крысы RBP определяли с помощью стандартной технологии иммуноферментного сэндвич анализа набором RayBio RBP4 Enzyme Immunoassay (EIA) (RayBiotech, Inc.). Чувствительность – 0,46 нг/мл. Детектируемый диапазон 0,1-1000 нг/мл. Воспроизводимость: внутрисерийная менее 10%, межсерийная – менее 15%.

Определение тканевого полипептидного антигена. TPA определяли методом иммуноферментного анализа с помощью набора Tissue Polypeptide Antigen (TPA) ELISA Kit (Cusabio). Чувствительность – 0,195 мЕ/мл. Линейный диапазон: 0,78-50 мЕ/мл. Воспроизводимость: внутрисерийная менее 8 %, межсерийная – менее 10%.

Определение моноцитарного хемотаксического белка-1. MCP-1 определяли методом иммуноферментного анализа с помощью набора Monocyte chemotactic protein 1/monocyte chemotactic and activating factor (MCP-1/MCAF) ELISA Kit (Cusabio). Чувствительность – 0,78 пг/мл. Линейный диапазон: 3,12-200 пг/мл. Воспроизводимость: внутрисерийная менее 8%, межсерийная – менее 10%.

Определение трансформирующего ростового фактора. TGF- β 1 определяли методом иммуноферментного анализа с помощью набора Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) ELISA Kit (Cusabio). Чувствительность – 1,56 пг/мл. Линейный диапазон: 6,25-400 пг/мл. Воспроизводимость: внутрисерийная менее 8%, межсерийная – менее 10%.

Определение уромодулина. Белок Тамм-Хорсфалла (уромодулин) определяли методом иммуноферментного анализа с помощью набора Uromodulin (UMOD) ELISA Kit (Cusabio). Чувствительность – 1,95 пг/мл. Линейный диапазон: 7,8-500 пг/мл. Воспроизводимость: внутрисерийная менее 8%, межсерийная – менее 10%.

Определение липидов в ткани почек. Для определения липидов получали 1:20 (м/об) гомогенаты сырой или замороженной ткани почек в 100% изопропанол в гомогенизаторе Поттера при температуре тающего льда. Гомогенаты центрифугировали при 10000×g 5 минут и в супернатанте определяли уровень общих фосфолипидов (DiaSys Phospholipids FS), холестерина и триглицеридов (Randox) на автоматическом биохимическом анализаторе KeyLab (BPC+Biosed s.r.l., Италия). Точность измерений проверяли по контрольному материалу (Randox).

2.2.11 Патоморфологические методы исследования

Нефробиоптаты почек получали под общим наркозом (ксилазин-золетил + фторотан) с помощью иглы-троакара с внутренним диаметром 1,3 мм при прокалывании одного из полюсов почки под углом 35°. Биопсийный материал в форме «червяка» переносили на биопсийную прокладку в промаркированную кассету и фиксировали в 10% растворе забуференного при pH 7,4 формалина (для обзорной окраски гематоксилином и эозином) или жидкости Дюбоска-Бразилия по Буэну (для окраски полихромными методами) [18, 35, 46, 64, 97].

Для погибших животных проводили некропсию с установлением причины смерти. Выживших животных выводили из эксперимента путём плановой эвтаназии, которую проводили одномоментной декапитацией под лёгким наркозом с тотальным обескровливанием и проводили вскрытие с макроскопическим и гистологическим исследованием почек. Макроскопическое описание проводили с применением системы оценок характера, цвета, плотности, консистенции, линейных размеров почек и их повреждений – локализации и обширности. Все отклонения от нормального строения фотографировали. Массовый коэффициент почек вычисляли при взвешивании парного органа вместе (правой и левой почки) и выражали в единицах мг ткани на г массы тела (МК, мг/г). Точность весов Sartorius (Германия) была верифицирована до процедуры взвешивания.

Процедура гистологического исследования при вскрытии животных после запланированной эвтаназии или гибели включала в себя эвисцерацию, взвешивание, вырезку, кассетирование, маркировку, фиксацию, проводку, заливку в парафиновые блоки, изготовление срезов, окраску, заключение под покровное стекло и микроскопию согласно общепринятым протоколам [18, 35, 46, 64, 97, 140, 416]. Исследованию подвергали продольный срез правой и поперечный срез левой почки. При установлении причины смерти использовали продольные срезы, а для морфометрии поперечные срезы почки.

Схема расположения слоёв на поперечном срезе почки представлена на рисунке 9.

Проводку срезов почек и нефробиоптатов (процессы фиксации, дегидратации, обезжиривания, перемешивания и парафиновой инфильтрации образцов биологического материала – Рисунок 10) и заливку в парафиновые блоки осуществляли на автоматическом гистопроцессоре Tissue Tek VP1 (Sakura) с использованием среды Гистомикс (температура плавления +52-54°C, ООО «ЭргоПродакшн», Россия) и диспенсере парафина ДП-01 по сокращённой программе для нефробиоптатов (4 часа) и в обычном ночном режиме (13 часов) в остальных случаях. Для репрезентативных выборок изготавливали серийные 3-5 мкм срезы, помещая на предметное стекло каждый 10-й срез по 2-4 среза с блока.

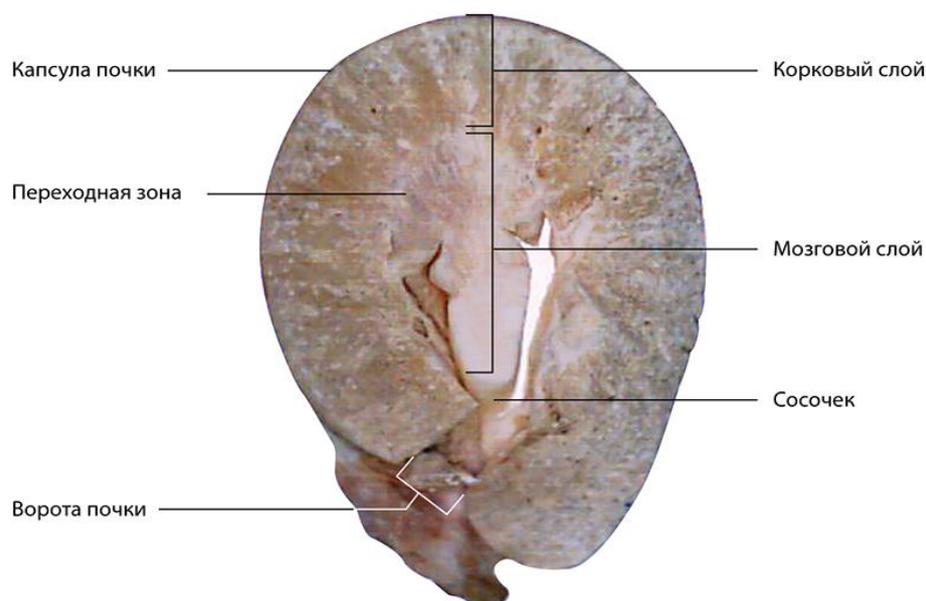


Рисунок 9 – Поперечный срез почки крысы после фиксации в формалине (типовая схема).

Step	Station	Solution	Set Time	Exec Time	Temp	P/V	Mix
1	1	Formalin	1:30	1:30	37C.	ON	Fast
2	2	Water	1:00	1:00	--	ON	Fast
3	3	Isopropyl Alcohol	0:40	0:40	37C.	ON	Fast
4	4	Isopropyl Alcohol	0:40	0:40	37C.	ON	Fast
5	5	Isopropyl Alcohol	0:50	0:50	37C.	ON	Fast
6	6	Isopropyl Alcohol	0:50	0:50	37C.	ON	Fast
7	7	Isopropyl Alcohol	1:00	1:00	37C.	ON	Fast
8	8	Isopropyl Alcohol	1:00	1:00	37C.	ON	Fast
9	9	Isopropyl Alcohol	1:00	1:00	37C.	ON	Fast
10	10	Isopropyl Alcohol	0:00	0:00	40C.	ON	Fast
11	11	Paraffin	1:00	1:00	58C.	ON	Fast
12	12	Paraffin	1:00	1:00	58C.	ON	Fast
13	13	Paraffin	1:00	1:00	58C.	ON	Slow
14	14	Paraffin	1:00	1:00	58C.	ON	Slow

Cassettes Count : 16

Рисунок 10 – Описание программы обработки тканей на гистопроцессоре Histo-Tek VP1.

Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Также препараты окрашивали методами PAS по Шиффу и Фёлгену [46, 64]. Кристаллические включения визуализировали при просмотре в поляризованном микроскопе Levenhuk 500T. Различение типа канальцев и сосудов проводили по топологии и с помощью флуоресцентно меченых лектинов LTL-FITC (для ПК) и DBA-FITC (для ДК и СТ), LEL-TR (для сосудов) [295].

Сумму баллов по интегральной шкале EGPI-score (анализ E – состояния эндотелия, G – клубочков, T – канальцев и I – интерстициальной ткани, от 0 до 4 балла) патологических изменений в ткани почек оценивали по методике Khalid U. et al., 2016 [323]. Ранее автором с использованием одномерного логистического регрессионного анализа связи между каждым компонентом по системе оценки EGPI и креатинином сыворотки через 48 часов, а также экспрессией NGAL и Kim-1, было показано, что тубулярные, эндотелиальные, клубочковые и тубулоинтерстициальные компоненты независимо связаны с креатинином сыворотки через 48 часов ($p < 0,05$), с NGAL и Kim-1 ($p < 0,0001$) при тепловой ишемии почки крыс [323]. Эти результаты позволили нами применить данную шкалу оценки при изучении патоморфоза токсических нефропатий, схожих по патогенезу с ишемическим ОПП, проведения морфометрических исследований [127, 331].

Гистохимическое окрашивание на апоптоз. Для выявления конденсации хроматина и морфологии ядер парафиновые 5 мкм гистологические срезы доводили через ксилол и батарею спиртов до воды. Срезы инкубировали 10 минут с 0,2% тритоном X-100 в фосфатно-цитратном буфере МакИльвана с pH 5,5 (0,9 г лимонной кислоты моногидрата и 2,5 г динатрия гидрофосфата в 100 мл воды), а затем трижды отмывали в фосфатно-цитратном буфере МакИльвана. На срезы наносили по 30 мкл 0,5 мкг/мл раствора Hoechst 33258 на 15 минут, а затем по 30 мкл 0,02% раствора актиномицина Д на 10 минут при инкубации в темноте при комнатной температуре. Срезы дважды промывали в дистиллированной воде по 5 минут и слегка подсушивали на воздухе. Для заключения среза под покровное стекло использовали 50% раствор нефлуоресцирующего глицерина в фосфатно-цитратном буфере МакИльвана с pH 5,5, а покровное стекло обводили лаком по периметру. Окрашенные препараты хранили в темноте. Исследование ядер нефротелия канальцев проводили на микроскопе Leica DM1000 (Германия) при длине волны возбуждения 352 нм и эмиссии 461 нм. Оценивали признаки апоптотической смерти клеток по морфологии ядер: маргинации хроматина, кариорексиса и кариопикноза [191, 594].

Для быстрой окраски всех структурных элементов использовали регрессивную трихромную процедуру по Д. МакФарлану (2 минуты, одностадийный метод Пикро-Маллори) с последующей отмывкой в синем дифференциаторе (5 минут). Для исследования состояния интерстициальной ткани, микрососудистого русла, отложений фибрина и гиалиновокапельной

дистрофии нефротелиоцитов срезы почек толщиной 2-3 мкм окрашивали полихромными методами Массона и Фрейзера-Лендрума [46, 364, 365, 384]. Для целенаправленного исследования на маркеры соединительнотканного матрикса (кислые гликозаминогликаны и коллагеновые волокна) кусочки ткани почек фиксировали 45 минут в жидкости Дюбоска-Бразилия по Буэну, затем сутки в 10% нейтральном забуференном формалине [458]. Срезы почек толщиной 3-5 мкм окрашивали альциановым синим в кислом буфере с рН 2,5 на гликозаминогликаны (ГАГ) [46] и пикро-сириусом красным на коллаген [262].

Для исследования на жир 20 мкм срезы формалин-фиксированных почек получали с помощью криостата, промывали в воде 5 минут для удаления формалина, затем промывали в 60% изопропанолу 2 минуты и окрашивали 0,2% раствором масляного красного О в пропиленгликоле в течение 15 минут. Далее срезы дифференцировали в 60% изопропанолу, в воде и заключали под покровное стекло горячим раствором глицерин-желатина [35, 46]. Оценивали число клеток поперечного сечения канальцев, содержащих мелкие, средние и крупные капли жира, окрашенные в оранжево-красный цвет при увеличении 400×, а также соотношение с общим числом клеток сечения канальца.

Микропрепараты исследовали методами флуоресцентной, светооптической и поляризационной микроскопии. При окраске пикро-сириусом красным в поляризованном свете коллагеновые волокна 1 типа светились жёлто-красным цветом, незрелые коллагеновые – жёлто-зелёным, а тонкие ретикулярные волокна 3 типа – зелёным цветом [476, 487, 488, 501]. Гистопрепараты исследовали на светооптическом микроскопе Leica DM1000. Микрофотографии получали с помощью камеры и программы ADF Image Capture (версия x64, 4.7.14011).

Проводили вычисление процента коллагеновых волокон от общей площади поля зрения среза почек в программе ImageJ-macros «MRI Fibrosis Tool» (Fibrosis Tool - ImageJ-macros - MRI's Redmine), проводили измерение высоты клеток и диаметра канальцев, клубочков и сосудов согласно принятым протоколам [88, 89].

2.2.12 Методы обработки и статистического анализа данных

Все первичные данные подвергали тщательной проверке правильности переноса с бумажного носителя в электронный. Математические преобразования проводили путём вычисления концентрационных индексов (КИ), нормализованного отношения (к креатинину), соотношения величин активности ферментов, логарифмирования – в программах Microsoft Excel, GraphPad Prism. Статистический анализ выполняли с использованием GraphPad Prism 8

(GraphPad Software Inc., Сан-Диего, Калифорния США). Проверку на нормальность распределения проводили по критерию Шапиро-Уилка. Нормальные значения у контрольных животных без воздействия вычисляли как бисигмальный диапазон – $Mean \pm 2SD$. Коэффициент вариации для внутрисерийных и межсерийных измерений, ROC-анализ [87] качества бинарной классификации (чувствительность и специфичность, дискриминационные характеристики AUC, дискриминационный (пороговый) уровень cut-off, отношение или коэффициент правдоподобия положительного результата (LR+)) вычисляли с помощью GraphPad Prism. Положительную и отрицательную прогностическую ценность (%), а также отношение диагностических шансов (DOR) вычисляли согласно принятым рекомендациям [253, 469]. Критическим считали $DOR \leq 3$ (менее 75% чувствительности). Статистическую обработку данных проводили с использованием дисперсионного анализа, параметрических (в случае нормального распределения) и непараметрических критериев – Краскела-Уоллиса и Данна при множественных сравнениях, Манна-Уитни при попарном сравнении. Для оценки выживаемости применялся критерий Мантела-Кокса. Критический уровень значимости везде был принят равным 0,05; в ряде таблиц и графиков представлены точные (4 знака) значения p. Для оценки связи двух величин и её направления использовался корреляционный анализ Пирсона и Спирмена с расчётом коэффициента корреляции r и уровня значимости p. Deskриптивные статистики включали в себя средние значения (Mean), стандартное отклонение ($\pm SD$), ошибку среднего значения ($\pm SEM$), 95% доверительный интервал (ДИ). Графическое представление результатов статистического анализа приводили на рисунках столбчатыми гистограммами, построением box-plots с 5-95% диапазоном процентилей (горизонтальная линия указывает медианное значение, прямоугольник указывает диапазон от 25% до 75% процентилей, усы простираются до максимальных и минимальных значений), строили графики выживаемости Каплана-Мейера.

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ НОВЫХ ПОДХОДОВ К ДИАГНОСТИКЕ ТОКСИЧЕСКИХ НЕФРОПАТИЙ

Гипотеза диагностики состояла из предположения, что воздействие токсического фактора на почки сопровождается каскадом биологических и биохимических реакций, индикаторами которых выступают молекулы биологических маркеров, а их выделение в биологические среды организма может быть детектировано с помощью чувствительных методов анализа. Методы диагностики нефропатий токсического генеза должны основываться на оценке, в большей степени, повреждения нефротелиоцитов, а затем функциональных изменений, поскольку биологический ответ на воздействие в первую очередь касается повреждения клеток почек. Повреждение может быть обнаружено по явным морфологическим изменениям, активации факторов выживания клеток, а также с помощью биомаркеров и методов визуализации почек. Использование токсических поражений почек на животных моделях является попыткой воспроизвести клиническую ситуацию заболеваний и полипрагмазии, которые лежат в основе патогенеза большинства случаев ОПП и ХБП токсического генеза [8, 62, 64, 65, 100, 115, 127, 128, 130, 167, 184, 194, 219, 225, 227, 250, 251, 260, 272, 285]. Наиболее перспективным направлением в решении этой задачи является исследование механизмов альтерации нефротелиоцитов [64, 65, 101, 416].

Исследования на животных предоставляют наиболее полную информацию о токсических свойствах химических веществ и лекарственных препаратов. Крысы и мыши разных линий являются стандартным объектом токсикологических исследований [65, 80, 101, 416]. Для воспроизведения ОПП токсического генеза использовали, в основном, лабораторных крыс, имеющих высокую степень гомологии по биомаркерам с человеком в S₁₋₃-сегментах проксимальных канальцев [225]. Проводили сбор мочи животных и образцов крови для выявления биомаркеров эффекта, а их количественное определение – с помощью видоспецифичных одноплексных ИФА-тест-систем (наборов). Функциональные изменения регистрировали по показателям концентрационных индексов по креатинину, осмолярности, клиренсу креатинина, величине максимальной реабсорбции воды, фракционной экскреции натрия. Развитие поражения почек контролировали гистологически и по результатам лабораторных исследований крови и мочи, содержанию АТФ в ткани почек. Модель считалась приемлемой при условии поражения не менее 50% животных с морфологически подтвержденным ОПП при введении токсической дозы нефротоксина. В качестве типовых

нефротоксинов применяли вещества из класса токсичных металлов, радионуклидов, гликолей, природных токсинов и ряда лекарственных препаратов.

Определение этиологического фактора – биомаркеров экспозиции проводили с помощью качественного обнаружения, спектрометрии, а также тонкослойной и газовой хроматографии. С помощью качественной реакции с резорцином в щелочной среде моча крыс, отравленных тетрахлорметаном, окрашивалась в розово-красный цвет. Тонкослойная хроматография на пластинах Сорбфил для ВЭТСХ с последующей спектрофотометрией в УФ-диапазоне длин волн позволила идентифицировать наличие в ткани почек орелланина, в моче – ряда лекарственных препаратов, темефоса. Результаты измерений нормализовали к уровню креатинина в моче. В исследовании токсикокинетики альфа-аманитина – ингибитора РНК-полимеразы 2-типа, было установлено, что после однократного введения экстракта Галерины осенней максимальные концентрации альфа-аманитина создаются в моче (до 3 суток) и ткани почек (до 4 суток), что коррелировало с гистологическими признаками поражения почек у животных. Наличие нескольких экстремумов концентрации альфа-аманитина в крови и печени соответствовало гепато-интестинальной циркуляции данного яда и повторному повреждению гепатоцитов. Визуализация некоторых результатов химико-токсикологического анализа и оценки кинетики нефротоксинов отражены на рисунках 11-14.

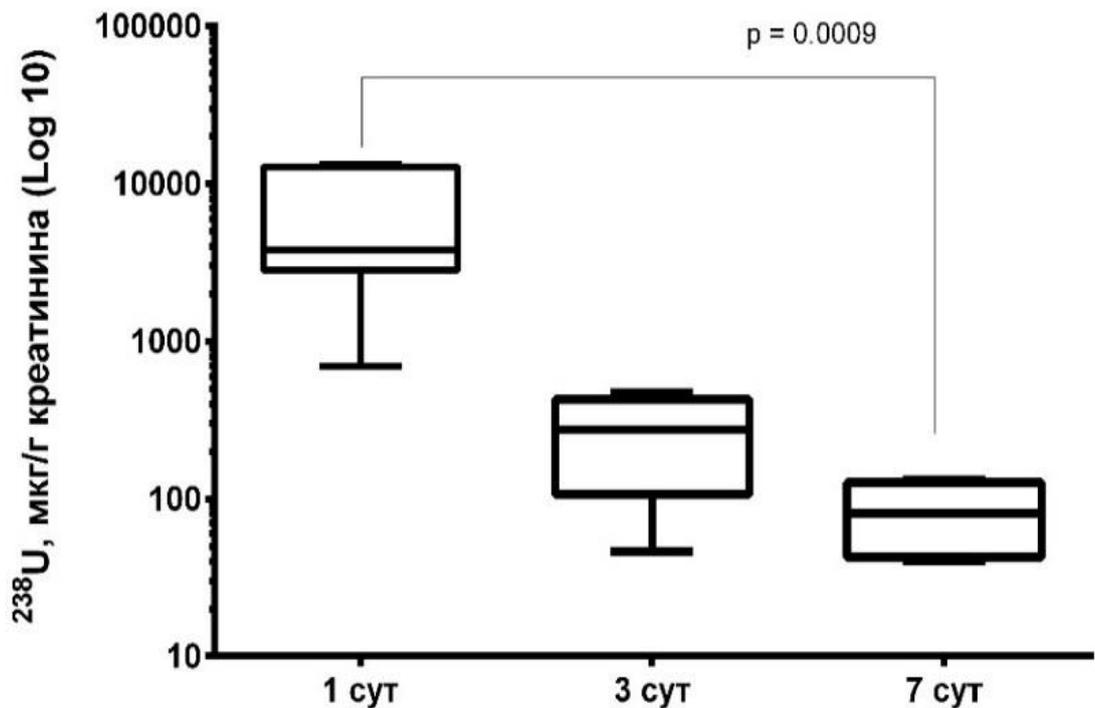


Рисунок 11 – Кинетика выведения изотопа [^{238}U] (нормализованная концентрация к уровню креатинина) с мочой у крыс при остром отравлении. Измерение методом ИСП-МС/МС.

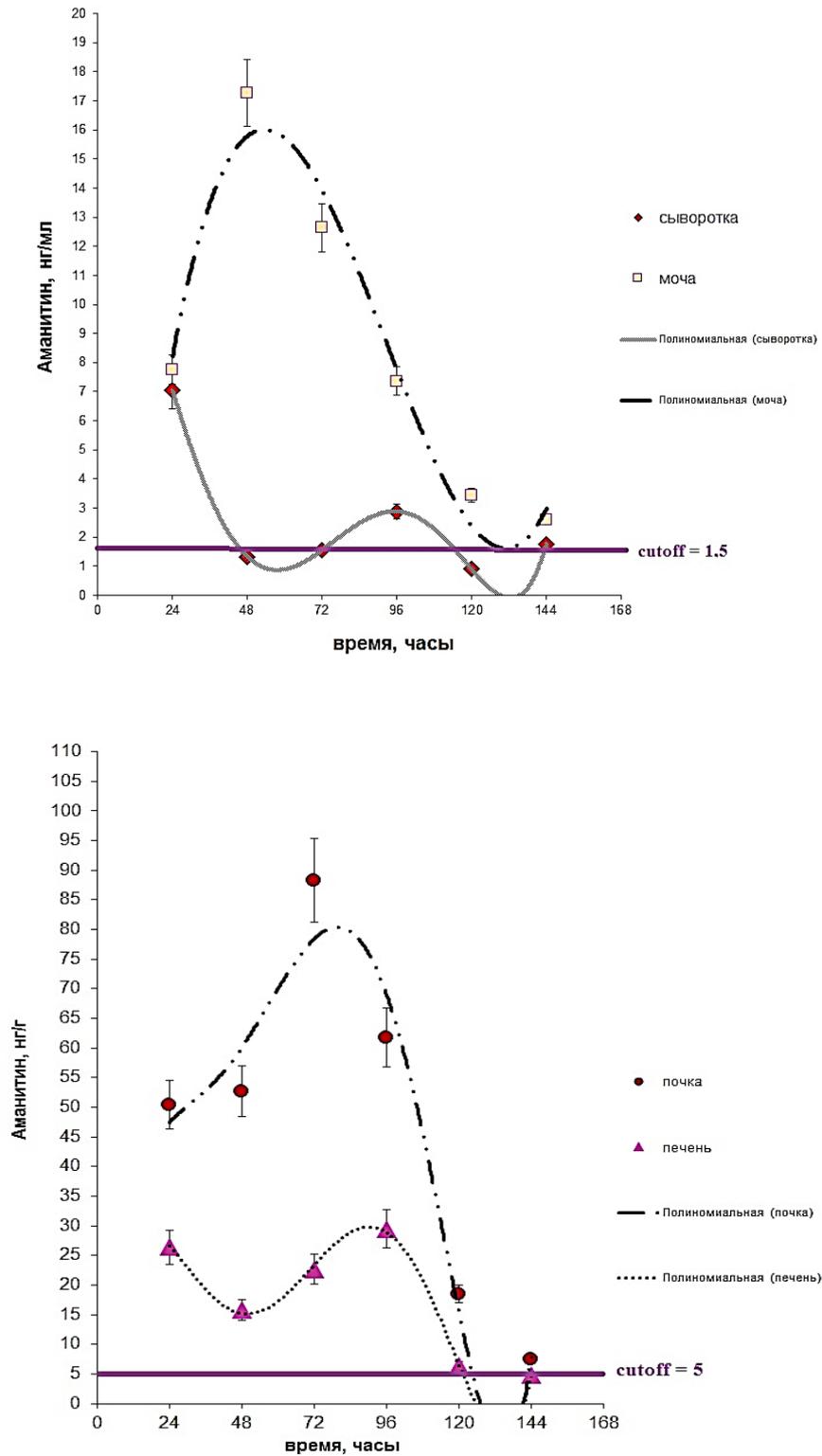


Рисунок 12 – Токсикокинетические кривые альфа-аманитина в моче, крови, печени и почке мышей *C57BL/6J* после однократного в/ж введения экстракта Галерины осенней 0,5 мл/20 г массы тела. Измерение методом ИФА.

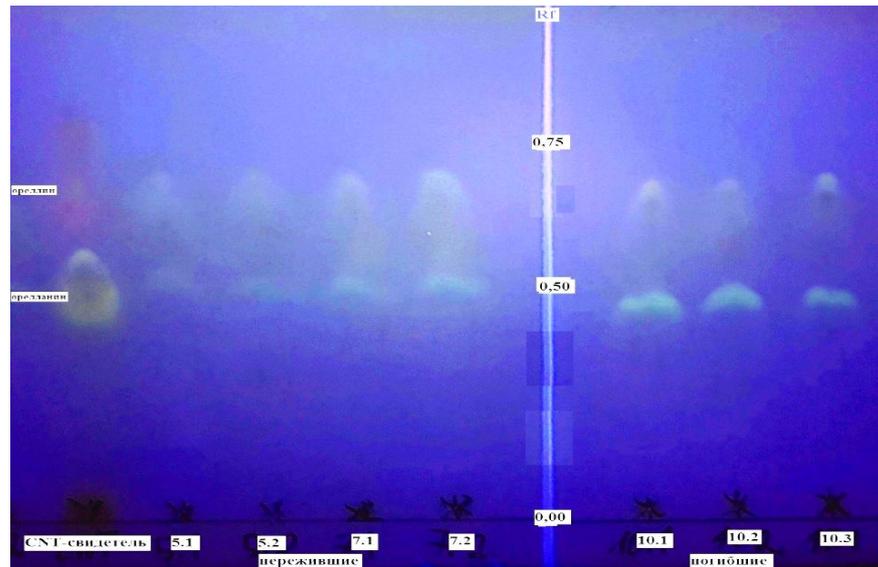


Рисунок 13 – Тонкослойная хроматограмма в УФ-свете с извлечениями из экстракта Паутинника (CNT-свидетель), ткани почек: переживших (5.1-5.2, 7.1-7.2) и погибших (10.1-10.3) крыс. Видны два пятна с Rf 0,46 орелланина и 0,64 ореллина.

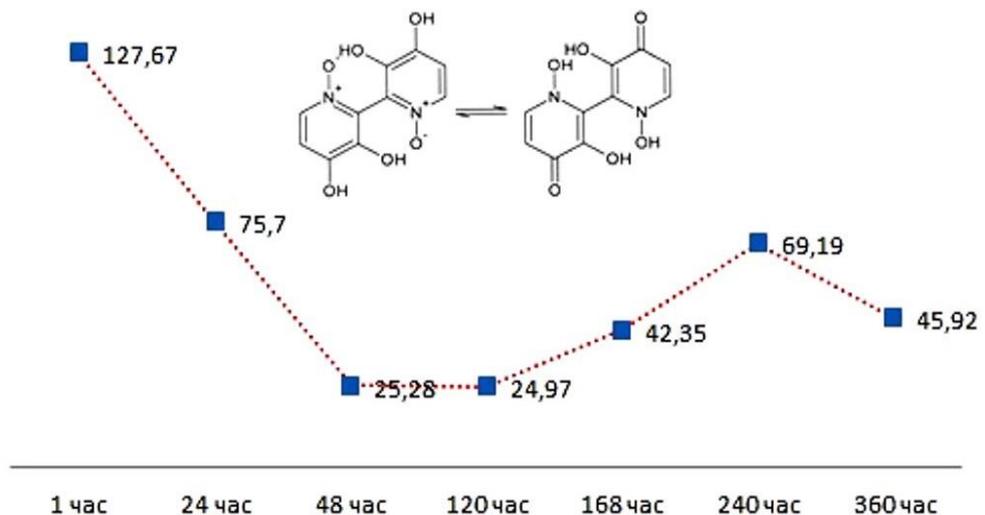


Рисунок 14 – Кинетика содержания орелланина в сырой ткани почек крыс (мкг/г), переживших отравление экстрактом Паутинника. Измерение методом денситометрии ТСХ-хроматограмм.

Кинетика содержания орелланина в почках животных имела две фазы: быстрого (1-48 часов) и медленного (больше 10 суток) снижения.

1,2-Дихлорэтан (ДХЭ) в противоположность хлороформу, дихлорметану и тетрачлорметану не выявляется качественной пробой с щелочным раствором резорцина в моче. Его токсификация происходит в гепатоцитах изоферментом СYP2E1 цитохрома P450 с

образованием 1,2-дихлорэтан-1-ола, затем превращении в крайне нестабильный хлоргидрин и, далее, в хлорацетальдегид, который превращается в нефротоксический аддукт с глутатионом под влиянием глутатион-S-трансферазы. Из хлоруксусного альдегида под действием альдегиддегидрогеназы образуется монохлоруксусная кислота, а под действием алкогольдегидрогеназы – 2-гидроксиэтил-S-глутатион. У животных, получавших ДХЭ в дозе $0,5 \times LD_{50}$ – 250 мкл/кг однократно в/ж, прямым парофазным методом газо-жидкостной хроматографии с детектором электронного захвата (ГЖХ-ДЭЗ) нами было выявлено в моче ДХЭ в диапазоне концентраций 0,05-0,90 мкг/мл (95% ДИ 0,09-0,90 мкг/мл) с суточным выделением 0,60-4,50 мкг/16ч (95% ДИ 1,14-3,93 мкг). Анализ корреляций Спирмена показал наличие прямых положительных корреляций между уровнем ДХЭ в моче и содержанием биомаркера нефротоксичности молекулы повреждения почек Kim-1 (Spearman $r=0,7427$, 95% ДИ 0,2764-0,9260, $p=0,0083$), а также активностью β -N-ацетилглюкозаминидазы (Spearman $r=0,8248$, 95% ДИ 0,4613-0,9512, $p=0,0019$) и величиной суммы баллов по шкале EGPI (Spearman $r=0,8064$, 95% ДИ 0,7126-0,8719, $p<0,0001$).

Таким образом, в токсикогенную фазу мониторинг отравляющих веществ в биожидкостях и ткани почек позволяет получить информацию о токсикокинетике нефротоксинов, установить этиологию токсической нефропатии, оценить наличие связи между уровнем токсиканта и рядом показателей гомеостаза.

3.1 Разработка новых критериев оценки развития токсических нефропатий

Непосредственно «мочевыми» биомаркерами поражения почек при отравлениях являются клинично-лабораторные показатели, в том числе из протеома мочи. Протеинурия тубулярного типа является самым характерным лабораторным критерием развития токсической нефропатии и ОПП ренального фенотипа [311]. Исследование уровня протеинурии у животных на моделях токсических нефропатий выявило наличие полового диморфизма в отношении количества белка в моче и его качественного состава. В отличие от чистого нефротического синдрома при токсических нефропатиях протеинурия была умеренной, а на фоне снижения концентрационной функции и полиурии даже минимальной. Данные по величине протеинурии у крыс при отравлении различными нефротоксинами представлены в таблице 7, рисунке 15.

В качестве критерия достоверности протеинурии были рассчитаны величины пороговых уровней для самцов и самок крыс, взятых из групп контроля из разных экспериментов. Для ядов дихлорэтана (ДХЭ), экстракта Паутинника красивейшего (ореллантин) и соли урана (УАД)

протеинурия была обусловлена как абсолютным возрастанием уровня общего белка в моче (орелланин, УАД), так и снижением концентрации креатинина в моче (ДХЭ, орелланин, УАД) из-за угнетения процессов ультрафильтрации. Пороговый уровень белка в моче был превышен у крыс при введении УАД (5,0 мг/кг, 126 сут, самцы и самки), экстракта Паутинника (орелланин). Величина индекса белок-креатинин (P/C-Ratio) увеличивалась в группах от 3 до 7,5 у.е. в группах при отравлении экстрактом Паутинника, дихлорэтаном, уранил ацетатом, трисульфеном и цисплатином. При этом, цисплатин оказал влияние на степень протеинурии только в отношении индекса P/C. Циклоспорин А и этиленгликоль у самок крыс не приводили к статистически достоверному увеличению протеинурии. Следовательно, использование измерения уровня белка и креатинина в моче даёт более точную информацию о нарушении реабсорбции белка проксимальными канальцами при сравнении групп по показателю индекса P/C. Также необходимо сопоставлять результаты анализа с величиной диуреза и пороговыми значениями бисигмального диапазона нормы (Рисунок 15).

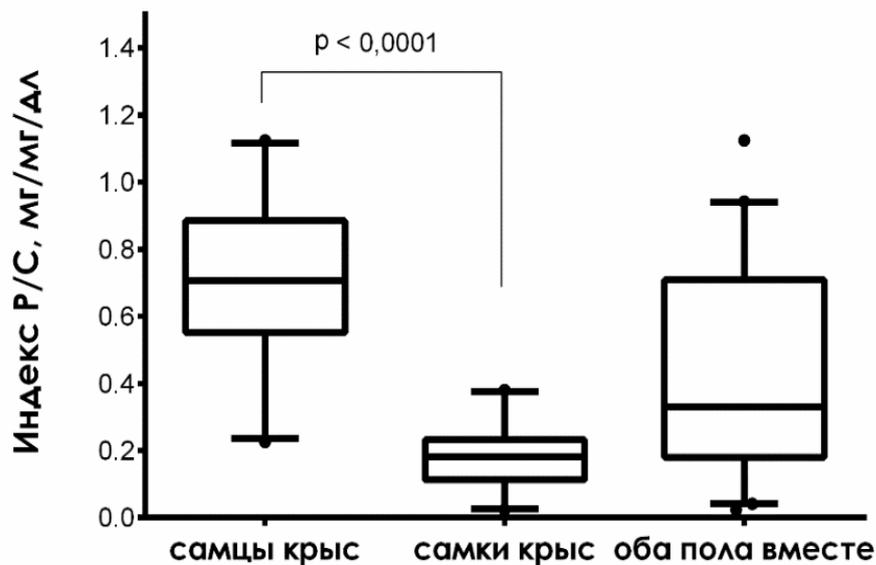


Рисунок 15 – «Нормальный» уровень протеинурии у крыс обоего пола.

Для выявления происхождения белки мочи далее разделяли методом электрофореза в денатурирующих условиях в геле полиакриламида со свидетелями молекулярных масс с целью их идентификации по масс-спектрам и сопоставления с данными электронных библиотек (с к.ф.-м.н. Забродской Я.А.). Образцы мочи были очищены путём гель-фильтрации и разбавлены без использования полимерных детергентов. Протеолиз осуществляли трипсином после отмывки от красителя при параллельном исследовании пустого участка геля полиакриламида

по такому же протоколу. Исследование качественного состава белков мочи «здоровых» крыс показало различия в доминировании одних белков у самцов и других у самок крыс (Рисунок 16).

Таблица 7 – Уровень протеинурии у крыс при действии типовых нефротоксинов (Mean±SEM)

Группы крыс	Белок, мг/дл	Креатинин, мг/дл	Индекс P/C Ratio
Интактные самцы (n=40)	61,2±7,0	85,0±7,8	0,70±0,05
Интактные самки (n=40)	16,0±2,6	80,7±9,0	0,18±0,02
ДХЭ (ОПП), самцы (n=16)	37,3±2,3	11,5±1,5*	3,55±0,32*
Орелланин (ОПП), самцы (n=16)	119,4±11,6*	33,7±7,1*	4,21±0,65*
УАД (ОПП), самцы (n=16)	126,8±9,5*	32,9±12,0*	6,97±1,16*
УАД, 0,5 мг/кг, 126 сут, самцы	57,0±12,3	55,2±12,3	1,05±0,11
УАД, 0,5 мг/кг, 126 сут, самки	72,9±10,4*	93,5±5,4	0,79±0,14*
УАД, 5,0 мг/кг, 126 сут, самцы	148,0±25,7*	60,0±6,7	2,41±0,23*
УАД, 5,0 мг/кг, 126 сут, самки	97,8±12,3*	57,1±3,0	1,71±0,18*
Трисульфон, 1500 мг/кг, самки	36,7±5,8*	54,8±7,9	0,67±0,03*
Цисплатин, 10 мг/кг, самцы (n=16)	82,9±27,7	69,2±28,5	1,28±0,19*
Циклоспорин А, 50 мг/кг, самки	19,8±4,6	57,2±7,4	0,31±0,04
ЭГ, 3 мл/кг, самки (n=16)	20,3±3,0	67,5±10,3	0,32±0,03
Пороговый уровень cut-off:			
- самцы <i>Wistar</i> (n=40)	>124,1	-	>1,12
- самки <i>Wistar</i> (n=40)	>39,2	-	>0,35

Примечание: * различия значимы по сравнению с контролем при $p < 0,05$

Половые различия проявлялись в превалировании у самцов в моче прекурсора альфа-2-уроглобулина с М.м. 19 кДа, у самок – легких цепей иммуноглобулина G с М.м. 28 кДа и их фрагментов с другими молекулярными массами. Апробация методического подхода определения некоторых белковых маркеров в моче крыс как метода диагностики токсической нефропатии была проведена на модели «гентамициновой нефропатии» у крыс обоего пола. Было научно обосновано, что для исследования изменения состава протеома мочи под действием нефротоксинов предпочтительно использовать самок животных из-за спермальной контаминации образцов мочи у самцов. Также проводили анализ уропротеинограмм при отравлении другими нефротоксинами до и после очистки и концентрирования образцов (Рисунки 17-18). На обзорных электрофореграммах белковых фракций мочи, при разделении в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, были выделены потенциально интересующие зоны, соответствующие белкам с различными молекулярными массами (таблицы 8-9, рисунок 19) с наибольшим числом белков с молекулярной массой меньше 78 кДа, соответствующих тубулярному типу уропротеинограмм. Липокалин-2, идентифицированный в моче отравленных крыс, при оценке методом ИФА был выявлен в мкг-диапазоне (тысячи нанограммов) в отличие от других белков, концентрации которых были на 2-3 порядка ниже.

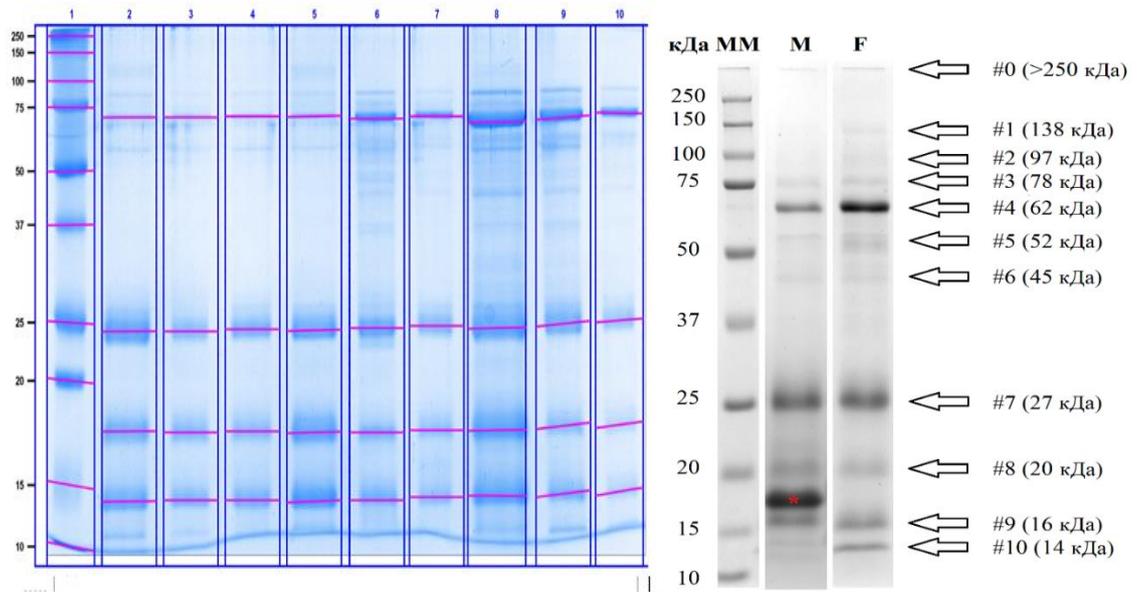


Рисунок 16 – Типовая электрофореграмма белков мочи крыс самцов (М) и самок (F) с выделением зон для идентификации.

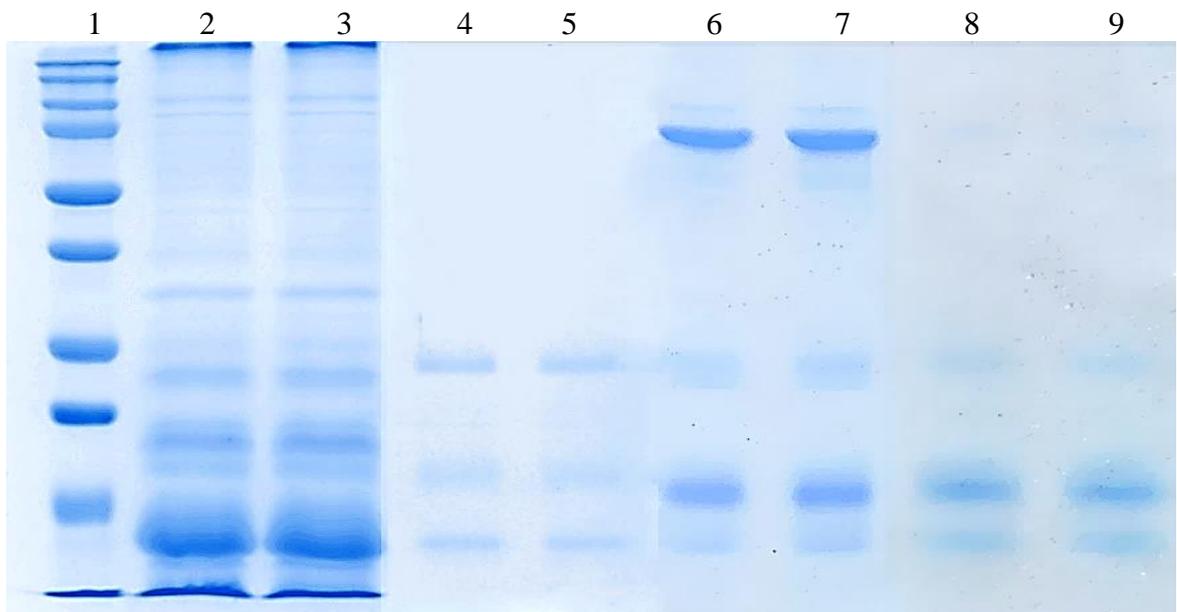


Рисунок 17 – Электрофореграмма белков мочи крыс в полиакриламидном геле: 1 – маркеры молекулярных масс Bio-Rad Precision Plus; 2-3 – отравление Паутинником; 4-5 – моча крыс отравления; 6-7 – контрольная моча крыс «патология»; 8-9 – контрольная моча крыс «норма».

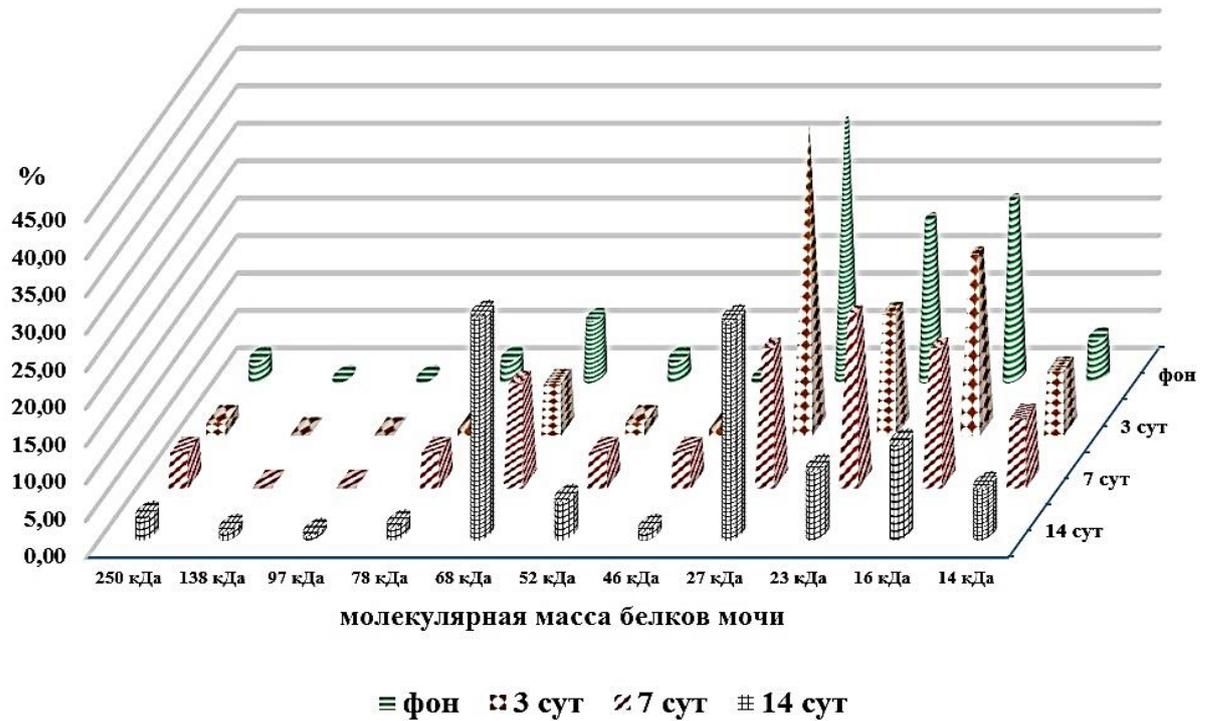


Рисунок 18 – Относительная доля белков мочи (%) с различной молекулярной массой, рассчитанная денситометрическим методом по маркерам молекулярных масс, на различные сроки после введения нефротоксической дозы гентамицина сульфата самкам крыс.

Таблица 8 – Некоторые идентифицированные методом MALDI-TOF/TOF белки

Электрофореграмма ПААГ		Зона, модель, идентифицированный белок	
1		2	
kDa	M OVA-ICN	зона	Нефрит, вызванный овальбумином
250		#1	Овальбумин [Gallus gallus] курица
150		#2	Овальбумин [Gallus gallus] курица
100		#3	Трансферрина прекурсор [Oryctolagus cuniculus]
75		#4	Альбумина прекурсор [Oryctolagus cuniculus]
50		#5	Овальбумин [Gallus gallus] курица
37		#6	Овальбумин [Gallus gallus] курица
25			
20			
15			
10			

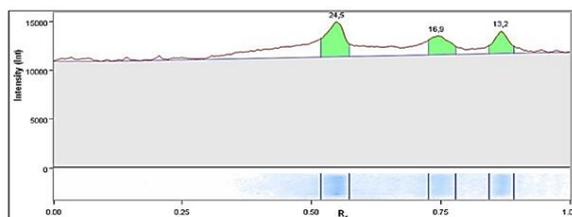
Продолжение таблицы 8

1		2	
kDa	M Sepsis	зона	Септический нефрит у крыс (самки)
250		#1	АлАП – аминопептидаза М
150		#2	Уромодулина прекурсор
100		#3	Трансферрина прекурсор
75		#4	Альбумина прекурсор Гемопексина прекурсор
50		#5	Альбумина прекурсор
37		#6	Альфа-амилазы 1 прекурсор С-протеазный ингибитор Альфа-1-антитрипсина прекурсор
25		#7	Орозомукоида прекурсор
20		#8	Орозомукоида прекурсор
15		#9	Гаптоглобина прекурсор
10		#10	Легкие цепи IgG лямбда-2 С регион
		#11	Липокалин-2
		#12	Бета-2-микроглобулина прекурсор
		ctrl#1	Легкие цепи IgG каппа С регион
		ctrl#2	Неустановленный пептид 2
		ctrl#4	Неустановленный пептид 1
kDa	M Gentamicin	зона	Гентамициновый нефрит у крыс (самки)
250		#1	Эпидермальный ростовой фактор
150		#2	Уромодулина прекурсор
100		#3	Трансферрина прекурсор
75		#4	Альбумина прекурсор
50		#5	Альфа-1-протеиназный ингибитор
37		#6	Актин цитоплазматический 1,2
25		#7	Бета-2-микроглобулина прекурсор
20		ctrl#1	Легкие цепи IgG каппа С регион
15		ctrl#2	Неустановленный пептид 2
10		ctrl#4	Неустановленный пептид 1

Продолжение таблицы 8

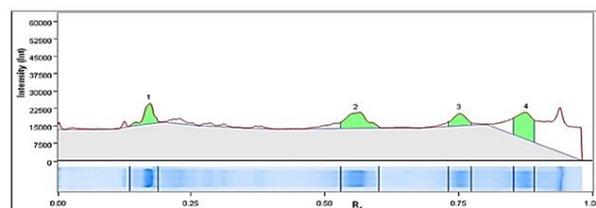
1		2	
kDa	M CNT	зона	Отравление паутиником красивейшим у крыс (самцы)
250		#1	Альфа-2-уроглобулина прекурсор
150		#2	Трансферрина прекурсор
100		#3	Альбумина прекурсор Гемопексина прекурсор
75		#4	Альфа-амилазы 1 прекурсор
50		#5	Альфа-1-антитрипсина прекурсор
37		#6	Кислый эпидидимальный гликопротеин D/E Альфа-1-микроглобулин
25		#7	Простатический стероид-связывающий белок C2 прекурсор
20		ctrl#1	Легкие цепи IgG каппа С регион
15		ctrl#2	Неустановленный пептид 2
10		ctrl#3	Альфа-2-уроглобулина прекурсор
		ctrl#4	Неустановленный пептид 1

Lane 3



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Adj. Volume (Int)	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		24,5	0,550	5 098 698	27 357 330	N/A	N/A	48,3	19,6
2		16,9	0,744	2 918 388	24 665 124	N/A	N/A	27,6	11,2
3		13,2	0,868	2 546 676	22 612 788	N/A	N/A	24,1	9,8

Lane 6



Lane	Band No.	Mol. Wt. (KDa)	Adj. Volume (Int)	Band %	Lane %
6	1	69,9	8 115 276	18,0	7,2
6	2	24,5	13 241 046	29,4	11,7
6	3	17,3	6 576 414	14,6	5,8
6	4	13,6	17 113 824	38,0	15,1

Рисунок 19 – Типовой протокол денситометрического анализа электрофореграмм «тубулярных» белков с М.м. от 10 до 70 кДа мочи крыс с токсической нефропатией.

Таблица 9 – Концентрация некоторых белков мочи, рассчитанная денситометрически

№ зоны	Белок	Концентрация, мг/дл (Mean±SD), сутки			
		фон	3 сут	7 сут	14 сут
0	Агрегаты белков	0,9±0,4	2,2±0,4	0,4±0,2	5,2±3,3
1	Аланинаминопептидаза	0	0	0	1,6±0,6*
2	Уромодулина прекурсор, Кадгерин-1	0	0	0	1,3±0,2*
3	Трансферрин	0,8±0,2	1,5±0,2	0,5±0,3	3,2±1,1
4	Альбумин	2,6±1,6	7,9±3,3	2,7±2,0	51,7±6,6*
5	Альфа-1-антитрипсин, Гемопексин	0,4±0,3	1,7±0,3	0,5±0,3	8,8±1,3*
6	Орозомукоида прекурсор	0	0,7±1,2	0,1±0,1	2,0±0,4*
7	Легкие цепи (L-Ig) каппа или лямбда типа С региона	12,6±2,8	47,6±8,4*	4,1±4,8	50,8±3,9*
8	Неустановленный пептид 2	8,5±4,2	18,8±6,1	5,3±5,1	15,8±5,5
9	Неустановленный пептид 1	8,9±4,6	28,1±9,1*	4,3±2,6	22,2±0,6*
10	Бета-2-микроглобулин	1,7±1,1	9,9±6,2	2,0±3,5	12,3±1,1*
Общая концентрация белка, мг/дл		17,7±10,2	144,5±50,1*	36,4±13,2	118,5±26,2*

Примечание: * различия значимы по сравнению с фоновыми значениями при $p < 0,05$

Мажорными компонентами протеомного профиля мочи крыс в контрольной группе (норма) являлись: у самцов – альфа-2 уроглобулина прекурсор, у самок – легкие цепи (L-Ig) каппа. При воздействии гентамицином в моче увеличивались концентрации АлАП, уромодулина, кадгерина-1, альбумина, альфа-1-антитрипсина, гемопексина, орозомукоида, легких цепей и бета-2-микроглобулина. Альфа-1-антитрипсин ($\alpha 1$ -АТ) синтезируется гепатоцитами, увеличение его уровней наблюдается при воспалении. $\alpha 1$ -АТ может способствовать усилению экспрессии MCP-1 и TNF- α в эпителиальных клетках почечных канальцев при патологии, $\alpha 1$ -АТ является неинвазивным диагностическим и прогностическим ранним биомаркером неселективной проницаемости при повреждениях почек при диабете и ранее не был исследован при токсических нефропатиях. У крыс в норме в моче обнаружен в минимальной концентрации, а клинически значимые концентрации прекурсора альфа-1-антитрипсина выявлялись в моче на фоне введения гентамицина к 14-м суткам. Исследование динамики выделения данного белка показало, что его появление в моче является качественным признаком нарушения реабсорбции в ПК.

Так, найденная зона с М.м. 138 кДа была подвергнута трипсиновому расщеплению с последующей идентификацией триптических фрагментов методом времяпролетной масс-спектрометрии MALDI-TOF/TOF. В результате MS-2 (MS/MS) анализа масс-спектрометр установил наличие фермента проксимальных канальцев аминоксипептидазы М или аланинаминопептидазы (АлАП, цинк-связывающая металлопептидаза), масс-спектр которой представлен в таблице 12, а уточнённая М.м. 109,2 кДа. У крыс самок на фоне введения

гентамицина наличие АлАП мочи удалось обнаружить только на 14-е сутки от начала введения гентамицина. В противоположность самкам у самцов АлАП может происходить из простатического сока и давать ложное увеличение активности в моче (относительная экспрессия мРНК по GeneAtlas U133A: АлАП в простате – 1008, в почках – 706,5), что существенно меняет клиническую интерпретацию появления данного маркера в моче в зависимости от пола. Другой белок мочи на фоне введения солей ртути, а также липополисахарида при моделировании септического шока, был идентифицирован как липокалин-2 (NGAL), и его масс-спектр представлен в таблице 10.

Таблица 10 – Коэффициент воспроизводимости рассчитанной молекулярной массы и процентной доли типовых белков мочи «здоровых» крыс

№ серии	Зона 1		Зона 2		Зона 3		Зона 4	
	Мм, кДа	% зоны	Мм, кДа	% зоны	Мм, кДа	% зоны	Мм, кДа	% зоны
серия 1	70,43	9,47	24,17	45,56	17,40	23,66	13,46	21,31
серия 2	70,43	11,58	24,17	31,04	17,35	30,67	13,55	26,71
серия 3	70,92	13,57	24,38	36,53	17,40	24,19	13,55	25,71
серия 4	70,92	6,17	24,27	22,55	17,35	21,61	13,46	49,67
серия 6	69,94	18,02	24,48	29,39	17,35	14,60	13,55	37,99
серия 7	70,92	28,78	24,69	32,37	17,45	16,85	13,85	22,00
серия 8	68,48	23,17	24,48	30,68	17,45	25,91	13,95	20,24
серия 9	70,43	27,38	24,89	39,06	17,66	14,33	14,16	19,23
серия 10	72,42	34,26	25,22	32,53	17,72	21,32	14,36	11,90
Mean	70,54	19,16	24,53	33,30	17,46	21,46	13,77	26,08
SD	1,04	9,73	0,35	6,50	0,14	5,43	0,33	11,29
CV%	1,47	50,78	1,43	19,52	0,80	25,32	2,40	43,30

Примечание: Mean – среднее значение; SD – стандартное отклонение; CV – коэффициент вариации

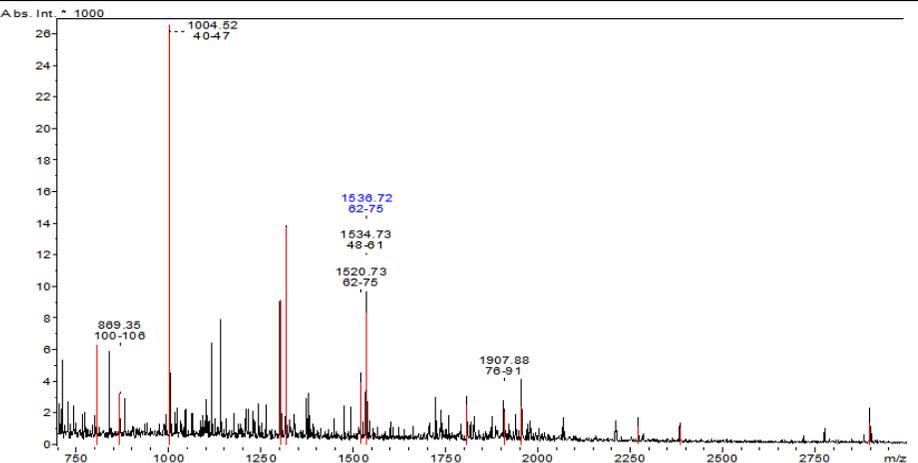
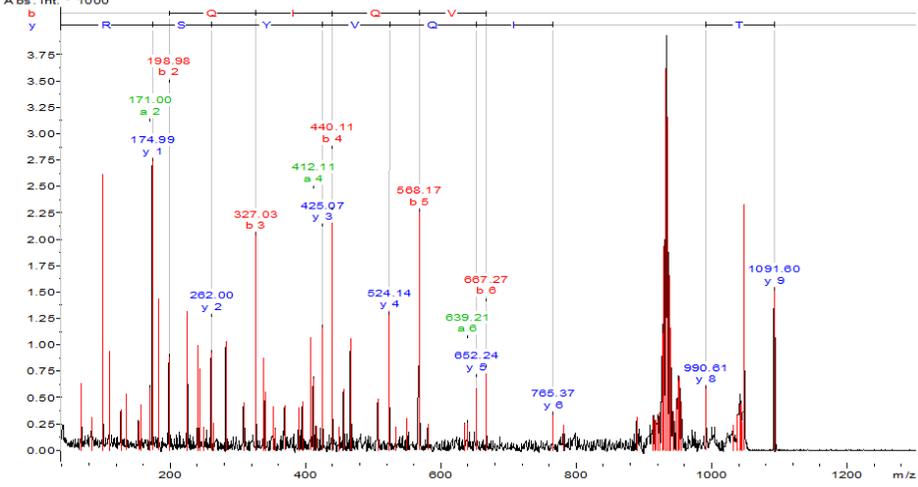
Величина внутрисерийного коэффициента вариации (CV) для разделения белков методом ЭФ составляла от 5,9% (при значительных количествах белка в моче) до 11,3% (при низком содержании белка в моче). Коэффициент вариации варьировал в зависимости от молекулярной массы белка и составлял в среднем 7,9%, что является приемлемым для аналитических методов клинической лабораторной диагностики. Самая высокая дисперсия была в группе «здоровых» животных, где CV% по всем зонам в среднем достигал 28-35% для межсерийных сравнений. CV для тубулярных белков с М.м. 13-24 кДа находился в диапазоне 19-43% (см. таблицу 11). Также было установлено что ориентирование по маркерам молекулярной массы является относительным и в процессе масс-спектрометрии истинная масса уточняется и может быть ниже теоретической, особенно для белков в зонах с М.м. больше 100 кДа.

В совокупности проведённое исследование продемонстрировало, что метод электрофоретического разделения белков мочи с денситометрическим определением фракций наряду с экспрессностью и превосходной чувствительностью имеет ограниченную точность из-за различий как в величинах коэффициентов вариации у «здоровых» и «больных» животных, так и внутри зон в зависимости от молекулярной массы. Выявляемые концентрации белков должны находиться в микрограммовом диапазоне, так как меньшие концентрации не выявляются при окрашивании гелей. Для правильной трактовки изменений уровня тех или иных белков в динамике все пробы с разных временных точек необходимо прогонять на одном геле в дубликатах или трипликатах вместе со стандартными свидетелями молекулярных масс с целью обеспечения равных величин времени и электрического поля у всех компонентов анализа для токсикологического протеомного метода изучения нефротоксичности.

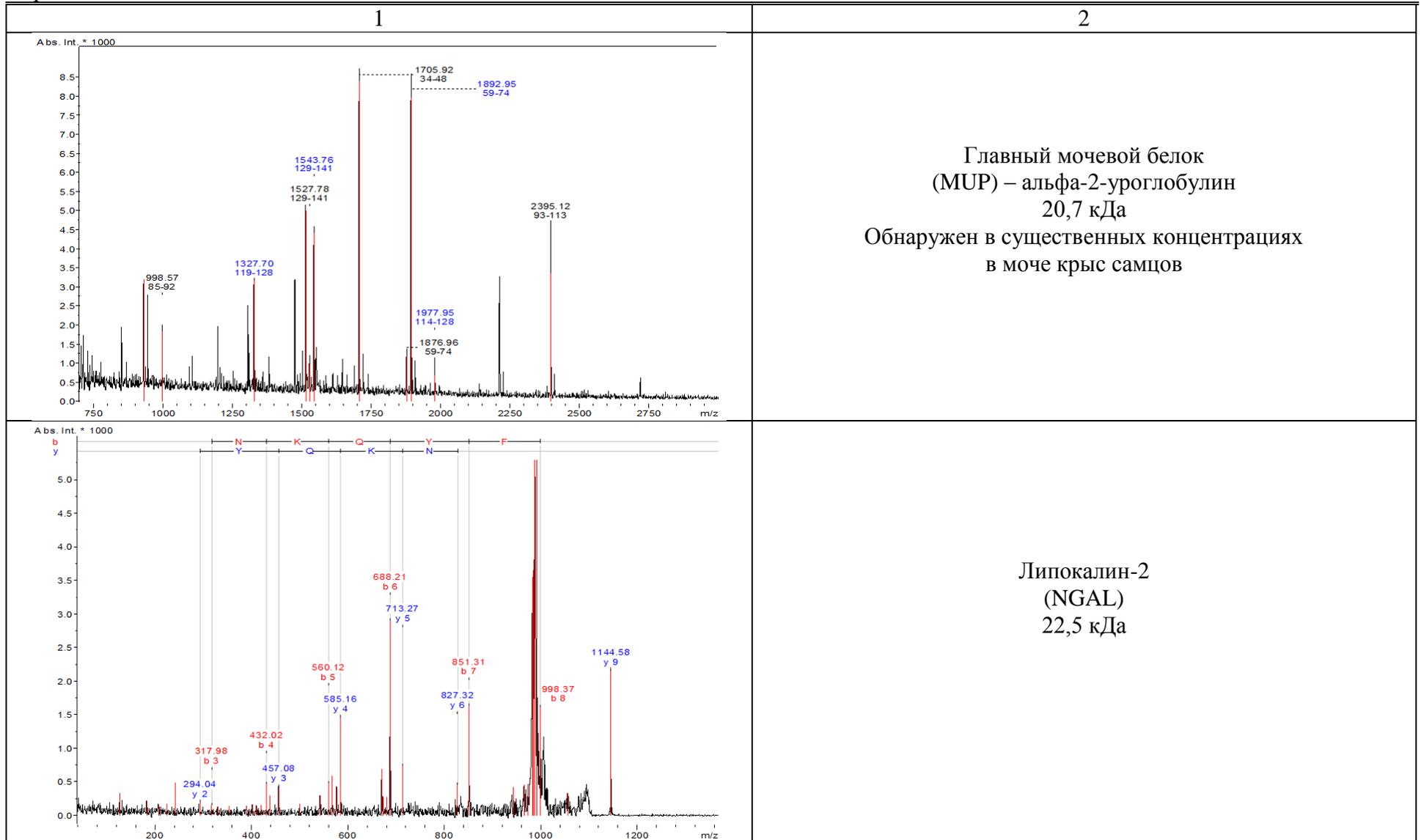
На модели токсической нефропатии на 14-е сутки после введения гентамицина сульфата тубулярный тип протеинурии у самок крыс характеризовался значимым увеличением содержания общего белка мочи в 4,8 раза по сравнению с контрольной группой за счёт фракций: агрегатов белков в 1,1 раза, альбумина в 4,4 раза, прекурсора альфа-1-антитрипсина в 4,5 раза, бета-2-микроглобулина в 1,5 раза, появлением белков АлАП, прекурсоров уромодулина, альфа-1-кислого гликопротеина, снижением уровня трансферрина. Применённая технология электрофоретического разделения с последующей идентификацией в динамике на разные дни после отравления позволила проследить качественное изменение мочевой экскреции некоторых белков, провести сопоставление данных с другими показателями функций почек и патоморфологическим подтверждением развития токсической нефропатии. Для обнаружения белковых маркеров в нанограммовом диапазоне концентраций применяли ультрафильтрацию с целью концентрирования образцов. В случае высоких фоновых значений мажорных фракций белков идентификация была затруднена и для этого применяли метод иммуноферментного анализа отдельных белков.

Другим методическим подходом к относительной оценке поражения проксимальных и дистальных канальцев является измерение активности ряда ферментов мочи [93]. Три фермента мочи происходят из щёточной каймы ПК-нефротелиоцитов: гамма-глутамилтрансфераза, аланинаминопептидаза и лейцинаминопептидаза, а лактатдегидрогеназа – из клеток ДК и СТ. Типирование ферментов мочи, не зависящих от пола, по их происхождению было проведено при энзиматическом определении активностей гамма-глутамилтрансферазы (ГТФ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Их соотношения, были >10 в случае поражения преимущественно проксимальных канальцев или <1 при поражении дистальных канальцев и собирательных трубочек. Данные представлены в таблице 12, соотношение ферментов при отравлении солями урана – на рисунке 20.

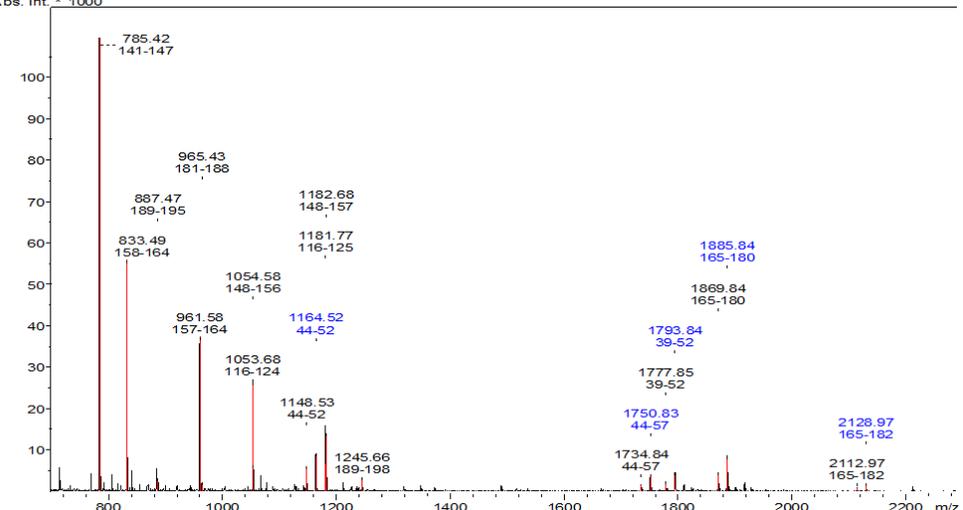
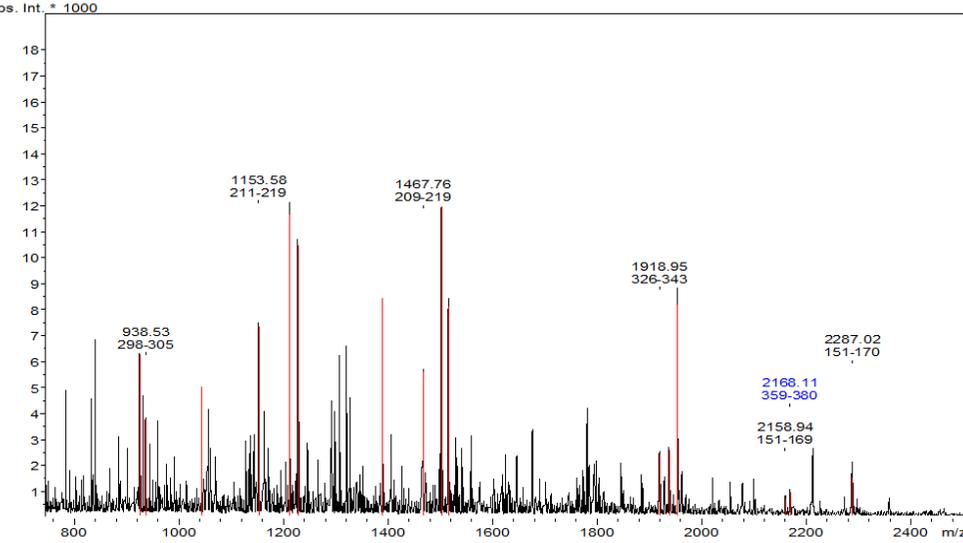
Таблица 11 – Спектры некоторых идентифицированных методом тандемной времяпролетной масс-спектрометрии MALDI-TOF/TOF белков мочи крыс обоего пола (спектры сняты и идентифицированы совместно с к.ф.-м.н. Я.А. Забродской на приборе ultrafleXtreme)

Масс-спектр триптических фрагментов белка	Идентифицированный белок и его молекулярная масса
<p style="text-align: center;">1</p> 	<p style="text-align: center;">2</p> <p style="text-align: center;">IgG каппа цепь C регион (лёгкие цепи иммуноглобулинов) 11,6 кДа</p>
	<p style="text-align: center;">Бета-2-микроглобулин 13,7 кДа</p>

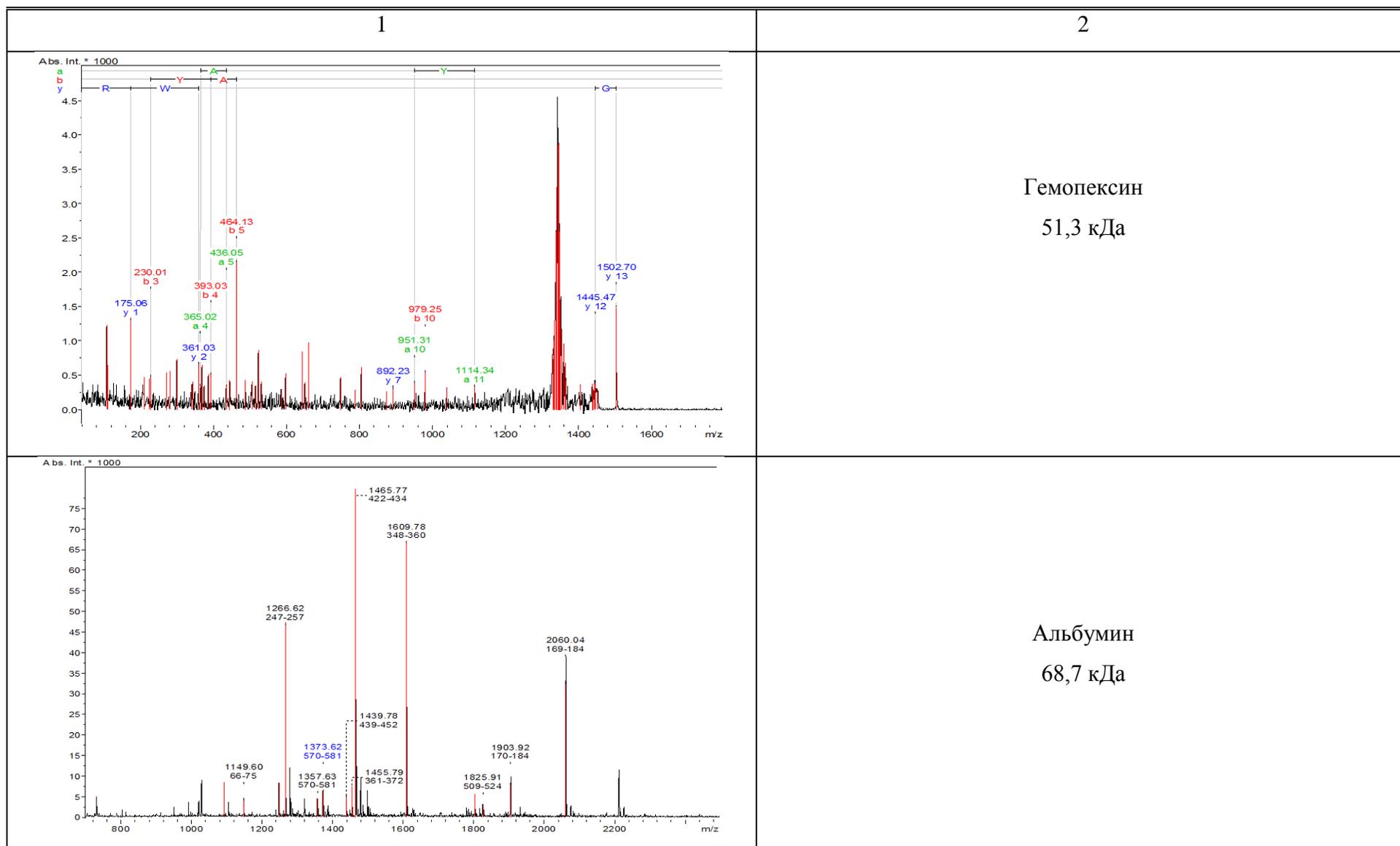
Продолжение таблицы 11



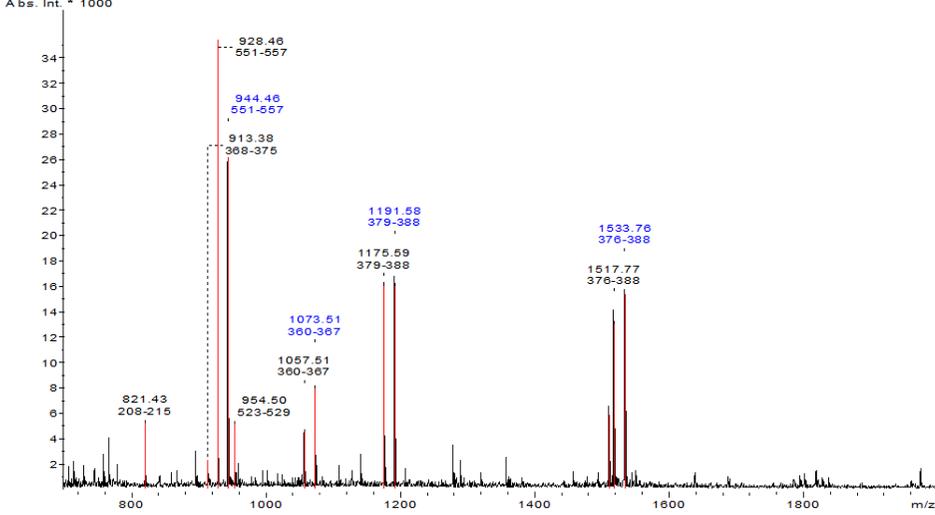
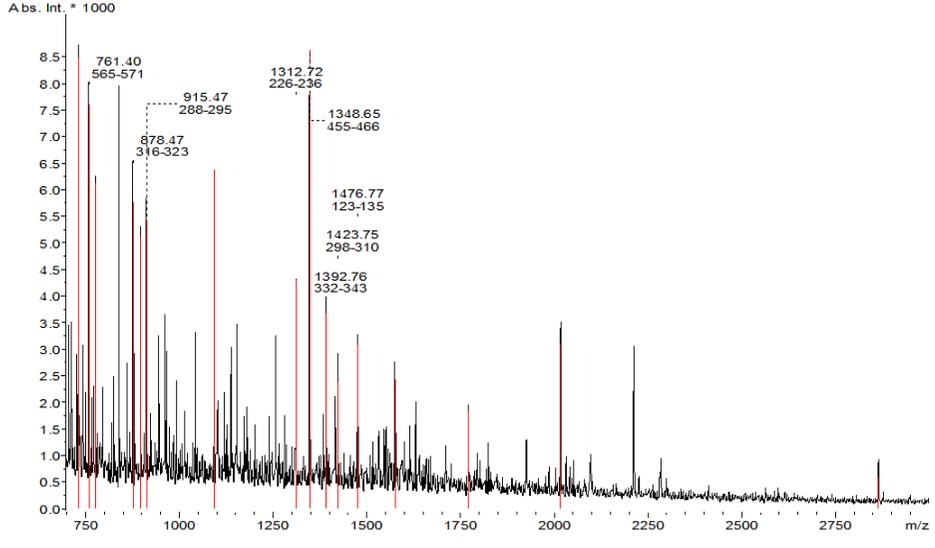
Продолжение таблицы 11

1	2																																																																																		
<p>Abs. Int. * 1000</p>  <p>Mass spectrum showing relative intensity (Abs. Int. * 1000) versus m/z. The x-axis ranges from 800 to 2200 m/z, and the y-axis ranges from 0 to 100. The base peak is at m/z 785.42. Other significant peaks are labeled with their m/z values.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>m/z</th> <th>Relative Intensity (approx)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>785.42</td><td>100</td></tr> <tr><td>141-147</td><td>100</td></tr> <tr><td>833.49</td><td>55</td></tr> <tr><td>158-164</td><td>55</td></tr> <tr><td>887.47</td><td>70</td></tr> <tr><td>189-195</td><td>70</td></tr> <tr><td>965.43</td><td>80</td></tr> <tr><td>181-188</td><td>80</td></tr> <tr><td>1054.58</td><td>50</td></tr> <tr><td>148-156</td><td>50</td></tr> <tr><td>1182.68</td><td>70</td></tr> <tr><td>148-157</td><td>70</td></tr> <tr><td>1181.77</td><td>60</td></tr> <tr><td>116-125</td><td>60</td></tr> <tr><td>961.58</td><td>40</td></tr> <tr><td>157-164</td><td>40</td></tr> <tr><td>1164.52</td><td>40</td></tr> <tr><td>44-52</td><td>40</td></tr> <tr><td>1053.68</td><td>30</td></tr> <tr><td>116-124</td><td>30</td></tr> <tr><td>1148.53</td><td>20</td></tr> <tr><td>44-52</td><td>20</td></tr> <tr><td>1245.66</td><td>10</td></tr> <tr><td>189-198</td><td>10</td></tr> <tr><td>1734.84</td><td>10</td></tr> <tr><td>44-57</td><td>10</td></tr> <tr><td>1793.84</td><td>40</td></tr> <tr><td>39-52</td><td>40</td></tr> <tr><td>1885.84</td><td>60</td></tr> <tr><td>165-180</td><td>60</td></tr> <tr><td>1889.84</td><td>50</td></tr> <tr><td>165-180</td><td>50</td></tr> <tr><td>1777.85</td><td>30</td></tr> <tr><td>39-52</td><td>30</td></tr> <tr><td>1750.83</td><td>20</td></tr> <tr><td>44-57</td><td>20</td></tr> <tr><td>2128.97</td><td>15</td></tr> <tr><td>165-182</td><td>15</td></tr> <tr><td>2112.97</td><td>10</td></tr> <tr><td>165-182</td><td>10</td></tr> </tbody> </table>	m/z	Relative Intensity (approx)	785.42	100	141-147	100	833.49	55	158-164	55	887.47	70	189-195	70	965.43	80	181-188	80	1054.58	50	148-156	50	1182.68	70	148-157	70	1181.77	60	116-125	60	961.58	40	157-164	40	1164.52	40	44-52	40	1053.68	30	116-124	30	1148.53	20	44-52	20	1245.66	10	189-198	10	1734.84	10	44-57	10	1793.84	40	39-52	40	1885.84	60	165-180	60	1889.84	50	165-180	50	1777.85	30	39-52	30	1750.83	20	44-57	20	2128.97	15	165-182	15	2112.97	10	165-182	10	<p>Альфа-1-кислого гликопротеина прекурсор 23,6 кДа</p>
m/z	Relative Intensity (approx)																																																																																		
785.42	100																																																																																		
141-147	100																																																																																		
833.49	55																																																																																		
158-164	55																																																																																		
887.47	70																																																																																		
189-195	70																																																																																		
965.43	80																																																																																		
181-188	80																																																																																		
1054.58	50																																																																																		
148-156	50																																																																																		
1182.68	70																																																																																		
148-157	70																																																																																		
1181.77	60																																																																																		
116-125	60																																																																																		
961.58	40																																																																																		
157-164	40																																																																																		
1164.52	40																																																																																		
44-52	40																																																																																		
1053.68	30																																																																																		
116-124	30																																																																																		
1148.53	20																																																																																		
44-52	20																																																																																		
1245.66	10																																																																																		
189-198	10																																																																																		
1734.84	10																																																																																		
44-57	10																																																																																		
1793.84	40																																																																																		
39-52	40																																																																																		
1885.84	60																																																																																		
165-180	60																																																																																		
1889.84	50																																																																																		
165-180	50																																																																																		
1777.85	30																																																																																		
39-52	30																																																																																		
1750.83	20																																																																																		
44-57	20																																																																																		
2128.97	15																																																																																		
165-182	15																																																																																		
2112.97	10																																																																																		
165-182	10																																																																																		
<p>Abs. Int. * 1000</p>  <p>Mass spectrum showing relative intensity (Abs. Int. * 1000) versus m/z. The x-axis ranges from 800 to 2400 m/z, and the y-axis ranges from 0 to 18. The base peak is at m/z 1153.58. Other significant peaks are labeled with their m/z values.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>m/z</th> <th>Relative Intensity (approx)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>938.53</td><td>7</td></tr> <tr><td>298-305</td><td>7</td></tr> <tr><td>1153.58</td><td>13</td></tr> <tr><td>211-219</td><td>13</td></tr> <tr><td>1467.76</td><td>13</td></tr> <tr><td>209-219</td><td>13</td></tr> <tr><td>1918.95</td><td>9</td></tr> <tr><td>326-343</td><td>9</td></tr> <tr><td>2168.11</td><td>5</td></tr> <tr><td>359-380</td><td>5</td></tr> <tr><td>2158.94</td><td>3</td></tr> <tr><td>151-169</td><td>3</td></tr> <tr><td>2287.02</td><td>7</td></tr> <tr><td>151-170</td><td>7</td></tr> </tbody> </table>	m/z	Relative Intensity (approx)	938.53	7	298-305	7	1153.58	13	211-219	13	1467.76	13	209-219	13	1918.95	9	326-343	9	2168.11	5	359-380	5	2158.94	3	151-169	3	2287.02	7	151-170	7	<p>Альфа-1-антитрипсина прекурсор 45,8 кДа</p>																																																				
m/z	Relative Intensity (approx)																																																																																		
938.53	7																																																																																		
298-305	7																																																																																		
1153.58	13																																																																																		
211-219	13																																																																																		
1467.76	13																																																																																		
209-219	13																																																																																		
1918.95	9																																																																																		
326-343	9																																																																																		
2168.11	5																																																																																		
359-380	5																																																																																		
2158.94	3																																																																																		
151-169	3																																																																																		
2287.02	7																																																																																		
151-170	7																																																																																		

Продолжение таблицы 11



Продолжение таблицы 11

1	2																								
 <p>Abs. Int. * 1000</p> <p>Mass spectrum showing relative intensity (Abs. Int. * 1000) versus m/z for Uromodulin precursor. The x-axis ranges from 800 to 1800 m/z. The y-axis ranges from 0 to 34. The base peak is at m/z 928.46 (551-557). Other significant peaks are labeled with their m/z values and corresponding scan ranges.</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Scan Range</th></tr></thead><tbody><tr><td>821.43</td><td>208-215</td></tr><tr><td>928.46</td><td>551-557</td></tr><tr><td>944.46</td><td>551-557</td></tr><tr><td>913.38</td><td>388-375</td></tr><tr><td>954.50</td><td>523-529</td></tr><tr><td>1057.51</td><td>380-367</td></tr><tr><td>1073.51</td><td>360-367</td></tr><tr><td>1175.59</td><td>379-388</td></tr><tr><td>1191.58</td><td>379-388</td></tr><tr><td>1517.77</td><td>376-388</td></tr><tr><td>1533.76</td><td>376-388</td></tr></tbody></table>	m/z	Scan Range	821.43	208-215	928.46	551-557	944.46	551-557	913.38	388-375	954.50	523-529	1057.51	380-367	1073.51	360-367	1175.59	379-388	1191.58	379-388	1517.77	376-388	1533.76	376-388	<p>Уромодулина прекурсор 71 кДа</p>
m/z	Scan Range																								
821.43	208-215																								
928.46	551-557																								
944.46	551-557																								
913.38	388-375																								
954.50	523-529																								
1057.51	380-367																								
1073.51	360-367																								
1175.59	379-388																								
1191.58	379-388																								
1517.77	376-388																								
1533.76	376-388																								
 <p>Abs. Int. * 1000</p> <p>Mass spectrum showing relative intensity (Abs. Int. * 1000) versus m/z for Transferrin. The x-axis ranges from 750 to 2750 m/z. The y-axis ranges from 0.0 to 8.5. The base peak is at m/z 761.40 (565-571). Other significant peaks are labeled with their m/z values and corresponding scan ranges.</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Scan Range</th></tr></thead><tbody><tr><td>761.40</td><td>565-571</td></tr><tr><td>778.47</td><td>316-323</td></tr><tr><td>878.47</td><td>316-323</td></tr><tr><td>915.47</td><td>288-295</td></tr><tr><td>1312.72</td><td>226-236</td></tr><tr><td>1348.65</td><td>455-466</td></tr><tr><td>1392.76</td><td>332-343</td></tr><tr><td>1423.75</td><td>298-310</td></tr><tr><td>1476.77</td><td>123-135</td></tr></tbody></table>	m/z	Scan Range	761.40	565-571	778.47	316-323	878.47	316-323	915.47	288-295	1312.72	226-236	1348.65	455-466	1392.76	332-343	1423.75	298-310	1476.77	123-135	<p>Трансферрин 76,3 кДа</p>				
m/z	Scan Range																								
761.40	565-571																								
778.47	316-323																								
878.47	316-323																								
915.47	288-295																								
1312.72	226-236																								
1348.65	455-466																								
1392.76	332-343																								
1423.75	298-310																								
1476.77	123-135																								

Продолжение таблицы 11

1	2
<p>Abs. Int. * 1000</p> <p>733.39 214.219 1094.58 660.668 897.42 319-325 779.39 446-451 2016.00 532-549 2861.43 371-396</p> <p>m/z</p>	<p>Кадгерина-1 (Е – эпителиальный) прекурсор 98,7 кДа</p>
<p>Abs. Int. * 1000</p> <p>783.32 959-964 913.52 2-9 1034.53 288-296 1213.65 724-733 1298.57 921-933 1377.67 206-218 1489.79 206-219 1571.80 658-672 1361.68 206-218 1517.76 842-853 1505.77 206-219 1708.83 363-378 1911.96 141-158 1993.99 363-380</p> <p>m/z</p>	<p>Аланинаминопептидаза (аминопептидаза М) 109,2 кДа</p>

Методически было установлено что при замораживании-оттаивании образцов мочи активность ГТФ исчезает за счёт инактивации, и анализ на данный фермент необходимо производить в день сбора мочи или производить измерение активности схожего по локализации и более стабильного фермента щелочной фосфатазы (ЩФ). Нормирование активности ферментов к креатинину мочи необязательно, клиническое значение имеет соотношение активностей ГТФ/ЛДГ или ЩФ/ЛДГ. На 1 сутки отравления УАД соотношение ферментов свидетельствовало о преимущественном поражении проксимальных канальцев, но на 3 и 7 сутки поражались также дистальные канальцы и показатель соотношения ферментов снижался. При многократном введении субтоксических доз цисплатина было зарегистрировано поражение ДК по снижению соотношения ГТФ/ЛДГ мочи (таблица 12). При этом было отмечено резкое снижение активности ГТФ мочи, что следует сопоставлять с относительной специфичностью цитоплазматической лактатдегидрогеназы как маркера повреждения нефротелия дистальных канальцев. Патоморфологически у крыс в почках выявили, наряду с интерстициальным нефрофиброзом (ТИФ), формирование кист из атрофичных дистальных канальцев. Полученные результаты согласуются с тем, что паттерны увеличения ферментов в моче различаются в зависимости от вида нефротоксина [278], а существенные разнонаправленные изменения активности ферментов в зависимости от объема выделяемой мочи в соответствии с фазами токсической нефропатии (олигурия или полиурия), не позволяют однозначно трактовать результаты и требуют соотнесения с величиной суточного или минутного диуреза, косвенно – с нарушенной концентрирующей функцией почек. Однако простота измерения активности двух-трёх ферментов мочи в рамках биохимического анализа мочи даёт возможность ориентировочно и косвенно выявлять локализацию поражения канальцев до проведения морфологического исследования.

Таблица 12 – Активность ферментов мочи у крыс (Mean±SEM, n=16)

Группы крыс	Ферменты мочи		
	ГТФ, Е/л	ЛДГ, Е/л	ГТФ/ЛДГ
Интактные самцы (контроль)	4,0±0,3	4,7±0,6	1,4±0,4
Интактные самки (контроль)	3,3±0,2	3,3±0,5	1,3±0,2
УАД, 20 мг/кг×1; 1 сут, самцы	1083,4±325,6*	27,6±6,7*	42,9±13,5*
Бихромат калия, 15 мг/кг×1, 1 сут, самки	1499,7±216,2*	225,7±22,7*	7,0±1,1*
Циклоспорин А, 50 мг/кг×1; 3 сут, самки	1229,1±363,2*	86,3±16,5*	14,2±2,9*
Амфотерицин Б, 15 мг/кг×2; 7 сут, самки	413,1±69,6*	67,6±15,8*	10,1±2,0*
Ацеклофенак, 150 мг/кг×1; 14 сут, самки	539,2±101,0*	11,5±2,7*	126,7±27,8*
Гентамицин, 60 мг/кг×5; 14 сут, самцы	2070,7±146,0*	151,3±27,8*	15,7±2,6*
Гентамицин, 60 мг/кг×5; 14 сут, самки	1226,2±302,7*	93,7±12,5*	12,4±2,0*
Цисплатин, 2 мг/кг×1,3,5 сут, 1 мес, самки	93,3±17,3*	343,6±61,0*	0,4±0,1*

Примечание: * различия значимы по сравнению с контролем при $p < 0,05$

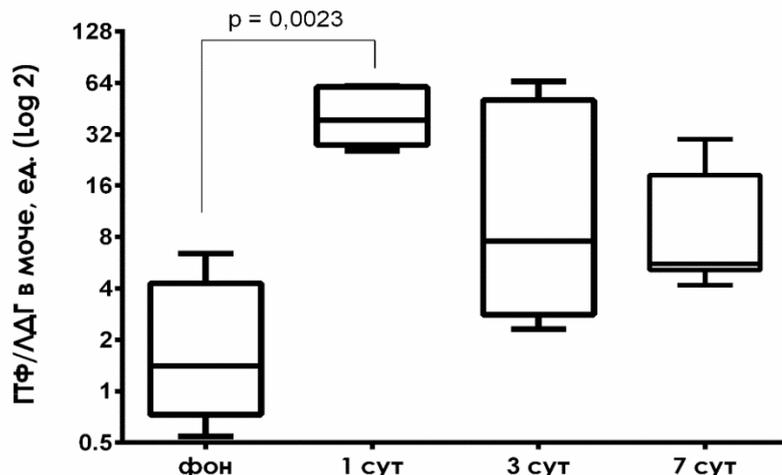


Рисунок 20 – Соотношение ферментов гамма-глутамилтрансферазы (ГТФ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в моче крыс на различные сроки отравления УАД.

Множественные сравнения по тесту Данна.

Острое токсическое повреждение нефротелия приводит к апоптотической, некроптотической и некротической гибели клеток, которая сопровождается высвобождением цитокинов, хемокинов и АФК, являющихся хемоаттрактантами и «свидетелями» химической травмы при ОПП [55, 392, 423]. Детальное и последовательное исследование биожидкостей с применением методов ИФА, ROC-анализа и оценки прогностической значимости проводили на модели отравления радио- и нефротоксическим УАД (30 мг на 100 г массы тела в/ж) на крысах. Использовали кинетический подход, основанный на трёх временных точках (ранняя, токсикогенная – 1-е сут, развёртывания симптомов, переходная токсикогенная-соматогенная – 3-е сут, поздняя – соматогенная некротическая и регенеративная, 7-е сут) измерения более специфичных для ОПП аналитов. Анализировали: креатинин сыворотки крови, в моче – ТРА, NGAL, Kim-1, RBP4, MCP-1, TGF- β 1. Биомаркеры определяли методом ИФА с помощью следующих наборов: Rat Tissue Polypeptide Antigen (TPA) ELISA Kit (Cusabio); Ra transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) ELISA Kit (Cusabio); Rat monocyte chemotactic protein 1/monocyte chemotactic and activating factor (MCP-1/MCAF) ELISA Kit (Cusabio); Rat RBP4 Enzyme Immunoassay Kit (RayBiotech, Inc.); Rat Kim-1 ELISA Test Kit (BioAssayWorks); Rat Lipocalin-2/NGAL ELISA (BioVendor, BioportoDiagnostics). Данные представлены на рисунке 21. Сравнивали ROC-кривые для нативных концентраций биомаркеров и нормализованных к креатинину (Рисунки 22-23, таблица 13).

Анализ двух или более временных точек для описания ROC-кривых биомаркеров меньше зависит от меж- или внутрииндивидуальной изменчивости, чем подход, основанный на единственной временной точке [87]. Чем выше значение коэффициента правдоподобия (Likelihood ratio – LR), тем больше вероятность «заболевания» у пациента. В связи с этим в качестве критического значения LR было взято значение 2, соответствующее большей чувствительности. По результатам анализа ROC-кривых отбирали только достоверные значения с AUC выше 0,5 и $p < 0,02$, характеризующие высокий уровень чувствительности и специфичности (таблица 13). Для классификации образцов на «здоровые» и «больные» был вычислен дискриминационный уровень (cut-off), выше которого расположены все образцы с явной патологией, а ниже – «здоровые». Диапазон дискриминационного уровня составил в крови: креатинин 87,5-92,5 мкмоль/л; в моче: тканевой полипептидный антиген (ТРА) 4,3-4,8 мЕ/мл (3-4 мЕ/мг креатинина), липокалин-2 (NGAL) 827,8-1208,0 нг/мл (1000-2000 нг/мг креатинина), молекула-1 повреждения почек (Kim-1) 0,22 нг/мл (0,3-1,3 нг/мг креатинина), ретинол-связывающий белок (RBP4) 0,8-1,1 нг/мл (1-1,2 нг/мг креатинина), моноцитарный хемотаксический белок-1 (MCP-1) 3-3,5 пг/мл (7-9 пг/мг креатинина) и трансформирующий ростовой фактор бета-1 (TGF- β 1) 13,9-29,6 пг/мл (4-63 пг/мг креатинина) в зависимости от стадии ОПП токсического генеза.

Концентрация белка Тамм-Хорсфалла (уромодулина) в моче крыс с ОПП не изменялась в раннем периоде нефропатии (1-7 сут). Уровни Kim-1, RBP4, MCP-1 и TGF- β 1 в моче значимо увеличивались на 3-е сутки ОПП токсического генеза и статистически отличались от значений в контрольной группе на 3-е (кроме TGF- β 1) и 7-е сутки (все, кроме ТРА) эксперимента.

Динамическая оценка уровня, клинически рекомендованного маркера сывороточного креатинина выявила превышение cut-off у 41,7% особей на 1-е сутки, 75% на 3 и 100% на 7 сутки после отравления. При сопоставимой чувствительности и специфичности только с 3 суток превышение уровня креатинина выше 97,0 мкмоль/л, а на 7-е сутки выше 330 мкмоль/л имело коэффициент правдоподобия равный бесконечности. Положительная прогностическая ценность составила 71,4% на 1-е, 83,3% на 3-и и 81,8% на 7-е сутки отравления, отрицательная прогностическая ценность – 58,8, 83,3 и 100%, соответственно. Отношение диагностических шансов (DOR) составило на 1 сут 3,6, на 3 сут – 25, на 7 сут – больше 200. Выявленные результаты подтвердили, что измерение уровня креатинина в сыворотке крови может быть использовано в качестве биомаркера состояния и функции ультрафильтрации, стойкое нарушение которой наступает при утрате более 60% действующих нефронов на 3-е сутки нефропатии.

ТРА в моче крыс существенно увеличивался уже в первые сутки после отравления в 9,8 раза по сравнению с интактными крысами ($p=0,0008$), в 14,4 раза к 3-м суткам ($p=0,0009$) и затем снижался к 7-м суткам. Анализ ROC-кривых показал, что площадь AUC на 1 сутки составила

0,96 ($p=0,00011$) для нативного и 0,93 ($p=0,0003$) для нормализованного по креатинину уровню ТРА, на 3 сутки $AUC=0,97$ ($p<0,0001$). Положительная прогностическая ценность составила 83,3% на 1-е, 90,9% на 3-и и 66,7% на 7-е сутки отравления, отрицательная прогностическая ценность – 71,4, 83,3 и 62,5%, соответственно. Отношение диагностических шансов (DOR) составило на 1 сут 12,5, на 3 сут – 50, на 7 сут – 3,3. Внутрисерийная воспроизводимость анализа составляла меньше 8%, межсерийная – менее 10%. Выявленные результаты продемонстрировали, что измерение уровня ТРА в моче может быть использовано для ранней диагностики нефротоксичности в качестве скринингового и диагностического биомаркера.

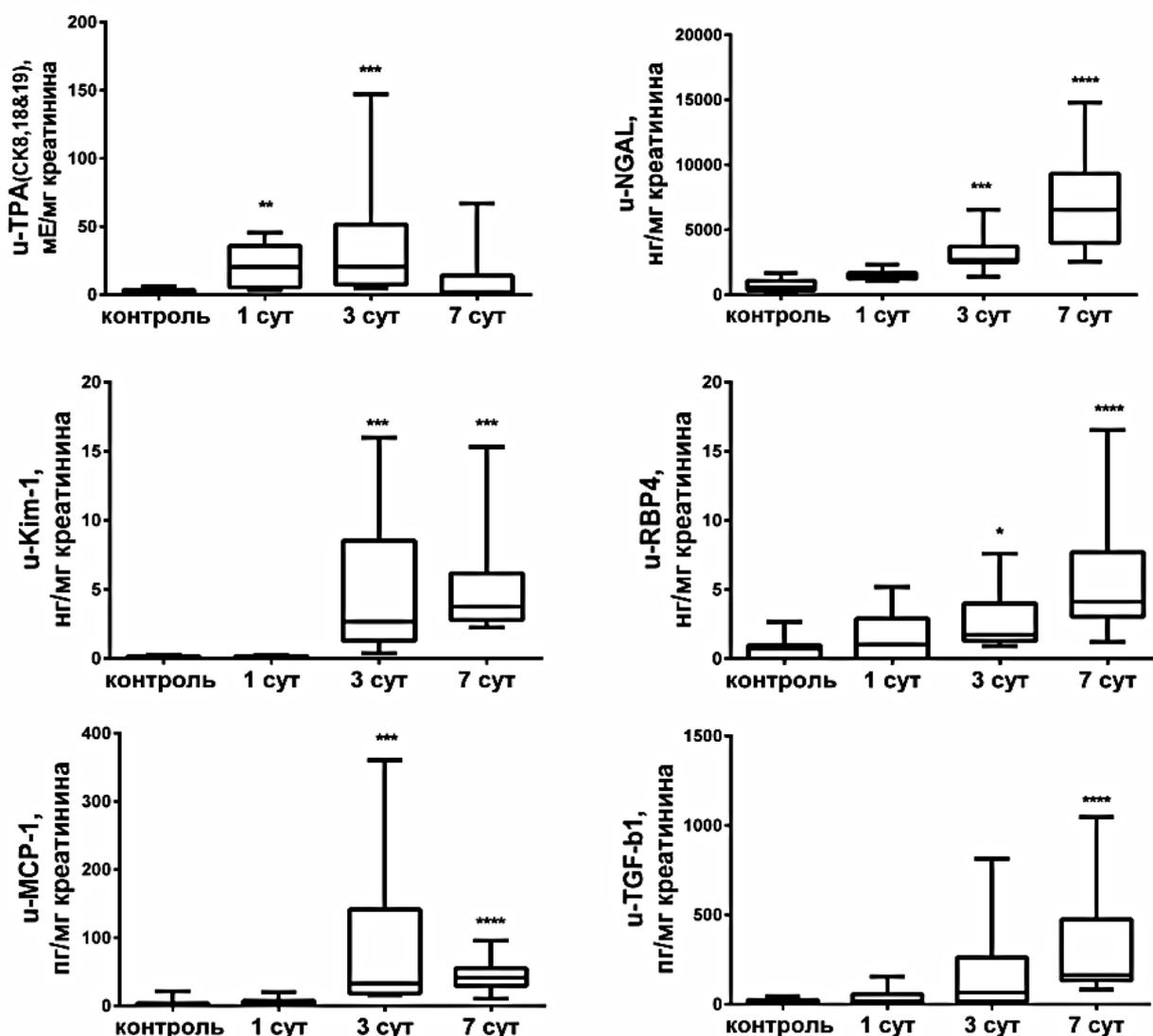


Рисунок 21 – Динамика мочевой экскреции биомаркеров (нормализованное к креатинину отношение) у крыс с токсической нефропатией. Множественные сравнения по тесту Данна. Пояснения в тексте.

Повышение уровня липокалина-2 в моче у крыс выше cut-off в ответ на повреждение функции реабсорбции в нефротелиоцитах отмечали на протяжении всех сроков регистрации и у 100% особей. Площадь AUC для NGAL на 1-е сутки составила 0,93 ($p=0,0003$), чувствительность 100,0%, специфичность 75,0%, LR больше 4; на 3-е сутки – AUC=0,99 ($p<0,0001$), чувствительность 100,0%, специфичность 91,7%, LR больше 12; на 7-е сутки AUC=1,00 ($p<0,0001$), чувствительность 100,0%, специфичность 91,7%, LR больше 12. Внутрисерийная воспроизводимость анализа составляла менее 12%. Положительная прогностическая ценность составила 87,5% на 1-е, 91,7% на 3-и и 80% на 7-е сутки отравления, отрицательная прогностическая ценность – 68,7, 91,7 и 91,7%, соответственно. Отношение диагностических шансов (DOR) составило на 1 сут 15,4, на 3 сут – 121, на 7 сут – 44. Выявленные результаты показали, что измерение уровня липокалина-2 в моче может быть использовано для ранней диагностики нефротоксичности в качестве скринингового и диагностического биомаркера.

Уровень TIM-1/Kim-1, белка из семейства эпителиального кадгерина, значимо увеличивался на 3-е сутки и статистически значимо отличался от значений у интактных крыс на 3-е и 7-е сутки эксперимента. Количество животных с уровнем Kim-1 выше cut-off составило 33,3% на 1-е сутки (AUC=0,597, $p=0,419$), 100% на 3-е и 7-е сутки, при этом значения выше 8,2 нг/мл на 7-е сутки имели положительное прогностическое значение в отношении летального эффекта. Площадь AUC ROC-кривых на 3-е сутки составила 1,00 ($p<0,0001$), чувствительность 100,0%, специфичность 91,7%, LR больше 12; на 7-е сутки AUC=1,00 ($p<0,0001$), чувствительность 100,0%, специфичность 91,7%, LR больше 12. Коэффициент вариации внутри дубликатов по оптической плотности был менее 15%. Положительная прогностическая ценность составила 75% на 1-е, 90,9% на 3-и и 92,3% на 7-е сутки отравления, отрицательная прогностическая ценность – 55, 84,6 и 100%, соответственно. Отношение диагностических шансов (DOR) составило на 1 сут 3,7, на 3 сут – 55, на 7 сут – больше 200. При этом необходимо подчеркнуть, что превышение пороговой величины 8 нг/мл чётко коррелировало со смертельным исходом вследствие острого канальцевого некроза, что позволило классифицировать Kim-1 как прогностический маркер нефротоксичности. Несмотря на описываемое в литературе раннее появление Kim-1 в моче [568], статистически достоверного увеличения его концентрации в первые сутки после отравления не было выявлено из-за малой частоты встречаемости у животных, показывающих превышение cut-off. Известно, что гены, кодирующие Kim-1 (Kim-1/Navs1), активируются в дедифференцированных эпителиальных клетках проксимальных канальцев в почках после ишемического или токсического повреждения [616]. Выявленные результаты продемонстрировали, что измерение уровня Kim-1 в моче может быть использовано для диагностики нефропатий токсического генеза.

При канальцевой протеинурии концентрация ретинол-связывающий белок в моче увеличивается вследствие нарушения реабсорбции белков в сегментах ПК путём клатрин-опосредованного эндоцитоза через два больших рецептора: мегалин и кубилин (CUBAM), однако клиническая чувствительность не была ранее оценена для токсической нефропатии. Впервые нами было установлено, что выделение ретинол-связывающего белка с мочой характеризовалось достоверным увеличением на 3-е и 7-е сутки. Площадь AUC на 3-е сутки составила 0,92 ($p=0,0005$), чувствительность 91,7%, специфичность 75,0%, LR больше 4; на 7-е сутки – AUC=0,90 ($p=0,0010$), чувствительность 83,5%, специфичность 91,7%, LR больше 10. Внутрисерийная воспроизводимость анализа составляла меньше 10%, межсерийная – менее 15%. Положительная прогностическая ценность составила 85,7% на 1-е, 91,7% на 3-и и 90,9% на 7-е сутки отравления, отрицательная прогностическая ценность – 64,7, 91,7 и 84,6%, соответственно. Отношение диагностических шансов (DOR) составило на 1 сут 11, на 3 сут – 121, на 7 сут – 55. Установленный пороговый уровень составил более 1 нг/мг креатинина.

Мочевая экскреция MCP-1 статистически достоверно увеличивалась на 3-е и 7-е сутки эксперимента. Количество животных с уровнем MCP-1 выше cut-off составило 66,7% на 1-е сутки, 100% на 3-е сутки и 91,7% на 7-е сутки. Площадь AUC ROC-кривых на 3-е сутки составила 0,96 ($p=0,0001$), чувствительность 100,0%, специфичность 83,3%, коэффициент правдоподобия LR более 6; на 7-е сутки – AUC=0,99 ($p<0,0001$), чувствительность 100,0%, специфичность 91,7%, LR больше 12. Положительная прогностическая ценность составила 66,7% на 1-е, 91,7% на 3-и и 90,9% на 7-е сутки отравления, отрицательная прогностическая ценность – 52,4, 91,7 и 84,6%, соответственно. Отношение диагностических шансов (DOR) составило на 1 сут 2,2, на 3 сут – 121, на 7 сут – 55. В основном макрофагальный MCP-1 экспрессируется в ответ на широкий спектр цитокинов и воздействие ионов железа (кровоизлияния), но может также продуцироваться фибробластами и эндотелиальными клетками. Так, ранее было показано, что нефротоксин малеат натрия увеличивал уровень и белка MCP-1 и его мРНК в моче, а введение препаратов железа больным с ХБП также индуцировало пиковый рост уровня MCP-1 в крови и моче, не влияя на уровень С-реактивного белка. Уремия при отсутствии повреждения почек индуцировала экспрессию гена NGAL, но не MCP-1, что предполагает возможность большей специфичности MCP-1 для диагностики ОПП [434].

Экскреция TGF- β 1 с мочой была увеличена на 3-е и 7-е сутки эксперимента. Количество животных с уровнем TGF- β 1 выше cut-off составило 50% на 1-е сутки, 75% на 3-е сутки и 100% на 7-е сутки после введения нефротоксина. Анализ ROC-кривых показал, что площадь AUC на 3 сутки составила 0,81 ($p=0,0111$), чувствительность 75,20%, специфичность 66,7%, коэффициент правдоподобия больше 2; на 7-е сутки – AUC=1,00 ($p<0,0001$), чувствительность 100,0%, специфичность 91,7% при LR больше 12.

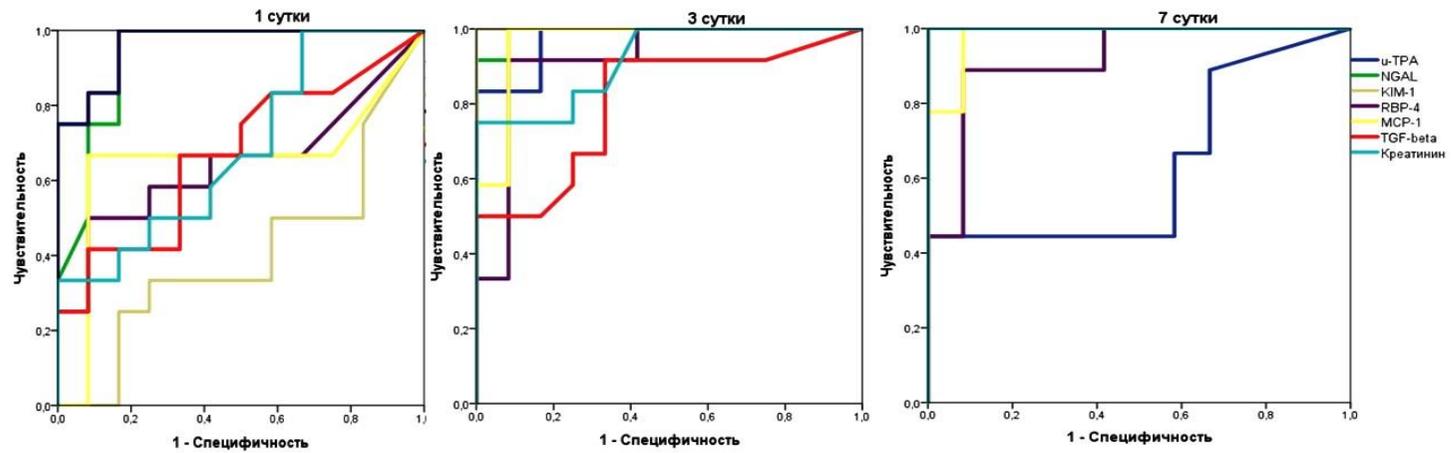


Рисунок 22 – ROC-кривые биомаркеров мочи (без нормализации) и креатинина крови на 1, 3 и 7 сутки у крыс с токсической нефропатией.

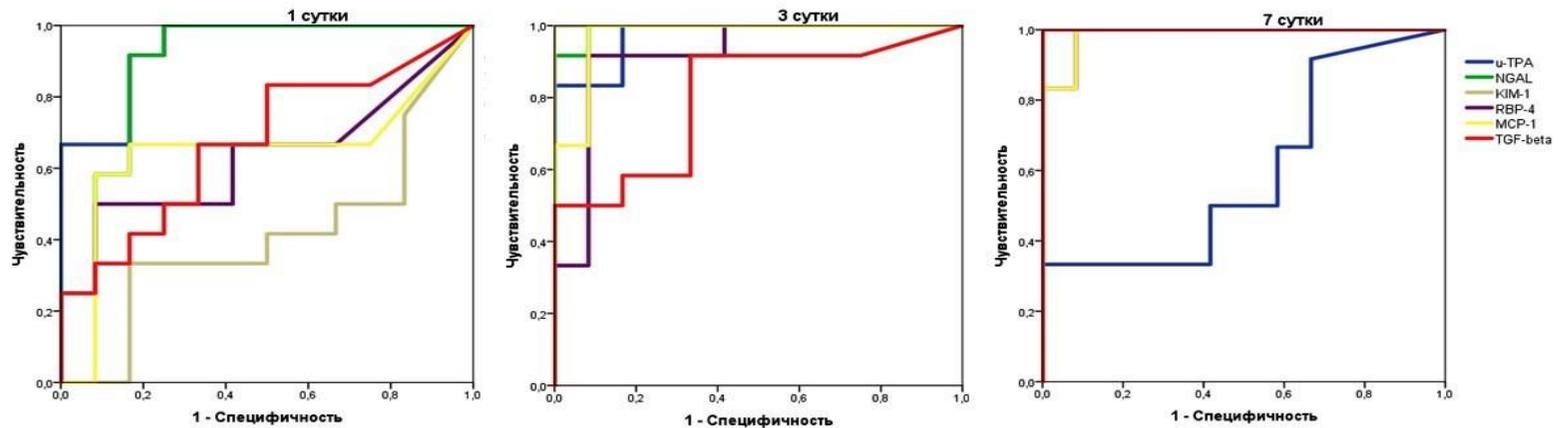


Рисунок 23 – ROC-кривые нормализованных по креатинину биомаркеров мочи на 1, 3 и 7 сутки у крыс с токсической нефропатией.

Таблица 13 – Результаты ROC-анализа ряда биомаркеров на 1, 3 и 7 сутки отравления УАД

Параметр	Показатели токсической нефропатии/временная точка		
	1 сут	3 сут	7 сут
Биомаркер	креатинин в крови (мкмоль/л)		
AUC/p	0,684/0,1260	0,917/0,0005	1,000/0,0001
Cut-off	-	97,0	330,00
Чувствительность	-	75,0%	100,0%
Специфичность	-	100,0%	100,0%
Правдоподобие	-	LR+=inf	LR+=inf
Биомаркер	тканевой полипептидный антиген в моче (мЕ/мг креатинина)		
AUC/p	0,938/0,0003	0,972/0,0001	0,597/0,4189
Cut-off	3,27	4,04	-
Чувствительность	100,0%	100,0%	-
Специфичность	75,0%	83,3%	-
Правдоподобие	LR+=4	LR+=6	-
Биомаркер	липокалин-2 в моче (нг/мг креатинина)		
AUC/p	0,896/0,0010	0,993/<0,0001	1,000/<0,0001
Cut-off	1016,19	1361,81	2108,17
Чувствительность	100,0%	100,0%	100,0%
Специфичность	75,0%	91,7%	100,0%
Правдоподобие	LR+=4	LR+=12	LR+=inf
Биомаркер	молекула-1 повреждения почек в моче (нг/мг креатинина)		
AUC/p	0,410/0,4529	1,000/<0,0001	1,000/<0,0001
Cut-off	-	0,33	1,26
Чувствительность	-	100,0%	100,0%
Специфичность	-	100,0%	100,0%
Правдоподобие	-	LR+=inf	LR+=inf
Биомаркер	ретинол-связывающий белок в моче (нг/мг креатинина)		
AUC/p	0,632/0,2727	0,917/0,0005	0,986/0,0001
Cut-off	-	1,17	1,18
Чувствительность	-	91,7%	100,0%
Специфичность	-	91,7%	91,7%
Правдоподобие	-	LR+=11	LR+=12
Биомаркер	моноцитарный хемотаксический белок-1 в моче (пг/мг креатинина)		
AUC/p	0,646/0,2253	0,972/0,0001	0,986/0,0001
Cut-off	-	9,85	7,43
Чувствительность	-	100,0%	100,0%
Специфичность	-	91,7%	91,7%
Правдоподобие	-	LR+=12	LR+=12
Биомаркер	трансформирующий ростовой фактор бета-1 в моче (пг/мг креатинина)		
AUC/p	0,674/0,1489	0,802/0,0120	1,000/<0,0001
Cut-off	-	4,72	63,65
Чувствительность	-	91,7%	100,0%
Специфичность	-	66,7%	100,0%
Правдоподобие	-	LR+=2,75	LR+=inf

Примечание: AUC – площадь под ROC-кривой, cut-off – пороговый уровень, LR – коэффициент правдоподобия, p – уровень значимости, s – сыворотка крови, u – моча. Прочерк – данные не рассчитывались на основании низкого уровня AUC

Внутрисерийная воспроизводимость анализа TGF- β 1 составила меньше 8%, межсерийная – менее 10%. Положительная прогностическая ценность составила 75% на 1-е, 85,7% на 3-и и 92,3% на 7-е сутки отравления, отрицательная прогностическая ценность – 55, 64,7 и 100%, соответственно. Отношение диагностических шансов (DOR) составило на 1 сут 3,7, на 3 сут – 11, на 7 сут – больше 200. Независимо от этиологии постоянно повышенные уровни TGF- β 1 причинно связаны с активацией профибротических сигнальных путей и прогрессированием заболевания, а TGF- β 1 является основной движущей силой почечного фиброгенеза. Макрофаги M2 типа, выделенные из почек в фазу восстановления, экспрессируют в 2,5 раза более высокие уровни TGF- β , чем макрофаги M₁ типа. TGF- β 1 активирует рецептор ALK₅ типа I, а также неканонические (src-киназа, EGFR, JAK/STAT, p53) пути, которые коллективно управляют фиброзной геномной программой [286], что приводит к переходу от ОПП к ХБП по типу нефрофиброза.

Для исследования взаимосвязей между маркерами применялся корреляционный анализ Спирмена, поскольку для всех переменных не выполнялись условия применения корреляционного анализа Пирсона. В контрольной и тестовой группах на день 1 статистически значимых корреляций между ненормализованными маркерами не выявлено, за исключением связи MCP-1 и креатинина на границе достоверности ($p=0,061$) у отравленных УАД крыс. Были установлены следующие статистически значимые корреляции между ненормализованными величинами биомаркеров в моче и креатинина в крови в тестовой группе животных: на день 3 положительные корреляции между u-TGF- β 1 и u-TPA ($p=0,018$), u-Kim-1 ($p=0,001$) и u-MCP-1 ($p=0,006$), а также между сывороточным креатинином и u-NGAL ($p=0,034$). На день 7 установлена отрицательная корреляция между u-MCP-1 и u-TPA ($p=0,013$) и положительная между u-MCP-1 и u-Kim-1 ($p=0,004$). На день 3 были установлены положительные корреляции между величинами нормализованных по креатинину биомаркеров u-TGF- β 1/креатинин и u-TPA/креатинин ($p=0,018$), u-Kim-1/креатинин ($p=0,001$) и u-MCP-1/креатинин ($p=0,006$), а также между креатинином крови и u-NGAL/креатинин ($p=0,034$). На день 7 выявлены отрицательная корреляция между u-MCP-1/креатинин и u-TPA/креатинин ($p=0,013$) и положительная между u-MCP-1/креатинин и u-Kim-1/креатинин ($p=0,004$).

Доказана статистически значимая положительная корреляция между уровнем u-TPA/креатинин мочи и суммой баллов по шкале EGPI на 1 сутки ($p=0,049$), u-TGF- β 1 и суммой баллов по шкале EGPI на 7 сутки ($p=0,046$). Высокоспециализированные эпителиальные проксимальные канальцевые клетки почки при отравлении дополнительно к СК8 и СК18 экспрессируют СК19, что может быть связано как с их апоптозом, так и с уменьшением степени дифференцировки клеток в ответ на нефротоксическое воздействие. В почках крыс, отравленных УАД, через 24 часа зарегистрировали $16,98 \pm 2,21\%$ клеток с признаками апоптоза (анизокариоз,

конденсированный хроматин, апоптотические тельца) и $18,83 \pm 3,91\%$ некротизированных клеток на каналец.

Для ряда отобранных маркеров проводили сравнительное исследование на максимальных чувствительности и специфичности (индекс Юдена) пороговых уровней cut-off биомаркеров в моче, нормализованных к уровню креатинина мочи, а также уровня креатинина в крови при отравлении различными нефротоксинами. Данные представлены в таблице 14.

Амфотерицин Б вызывал избирательное поражение ДК и СТ, поэтому не было выявлено существенного выделения с мочой Kim-1.

Оценка чувствительности биомаркеров ОПП в моче Kim-1, RBP4 и MCP-1 показала, что данные маркеры с высокой степенью достоверности увеличиваются в ответ на воздействие ряда нефротоксинов с различным химическим строением и механизмом действия на структуры нефрона. Специфичность данных маркеров выражалась в пороговом уровне cut-off, который, однако для ряда нефротоксинов имел схожие величины, но отмечались также и исключения. Так, возрастание уровня cut-off Kim-1 в моче отмечалось в ряду дихлорид ртути (сулема) > паутичник (орелланин) > гентамицин >> мертиолят, при отравлении амфотерицином Б уровень Kim-1 в моче не изменялся; для ретинол-связывающего белка-4 в ряду амфотерицин Б > паутичник (орелланин) \geq гентамицин \geq дихлорид ртути (сулема) > мертиолят; для моноцитарного хемотаксического белка-1 в ряду амфотерицин Б \geq гентамицин > паутичник (орелланин) > дихлорид ртути (сулема) > мертиолят; в случае креатинина крови cut-off увеличивался в ряду дихлорид ртути (сулема) \geq паутичник (орелланин) \geq амфотерицин Б \geq гентамицин > мертиолят. Самые существенные различия были установлены в паре «неорганическое соединение ртути дихлорид и её органическое производное мертиолят». Полученные данные были сопоставимы с величиной полуметальной дозы дихлорида ртути и мертиолята.

Полученные нами результаты измерения Kim-1 при воздействии различных нефротоксинов согласовывались с данными немецких специалистов, показавших что достаточная систематическая ошибка в уровнях Kim-1 в моче, является индикатором невозможности определения общего и методологически независимого порога cut-off для этого биомаркера [228, 229], однако для токсического действия цисплатина данный биомаркер оказался чрезвычайно чувствительным с ростом концентрации в моче с первых 6 часов после воздействия. С другой стороны, изменяющиеся пороговые величины Kim-1, TGF- β и креатинина свидетельствуют о значении этих биомаркеров в качестве показателей меняющихся фаз заболевания – острого повреждения почек токсического генеза.

Таблица 14 – Влияние различных по химическому строению нефротоксинов на уровни cut-off некоторых биомаркеров ОПП в моче и креатинина в крови крыс на различные сроки отравления при установленных максимальных чувствительности и специфичности

Нефротоксин	Сулема	Мертиолят			Амфотерицин Б		Гентамицин		Паутичник
Сроки	1 сут	3 сут	7 сут	3 сут	7 сут	14 сут самцы	14 сут самки	3 сут	
Биомаркер	молекула-1 повреждения почек в моче (нг/мг креатинина)								
AUC, p (точно: 4 знака)	1,00 p=0,0008	1,00 p=0,0008	1,00 p=0,0008	0,68 p=0,2076	0,54 p=0,7527	1,00 p=0,0008	1,00 p=0,0008	1,00 p=0,0008	
Cut-off	0,19	14,62	18,95	-	-	4,55	2,39	1,00	
Чувствительность	100,0%	100,0%	100,0%	-	-	100,0%	100,0%	100,0%	
Специфичность	100,0%	100,0%	100,0%	-	-	100,0%	100,0%	100,0%	
Правдоподобие	LR+=inf	LR+=inf	LR+=inf	-	-	LR+=inf	LR+=inf	LR+=inf	
Биомаркер	ретинол-связывающий белок в моче (нг/мг креатинина)								
AUC, p (точно: 4 знака)	1,00 p=0,0008	1,00 p=0,0008	1,00 p=0,0008	0,53 p=0,8336	0,81 p=0,0357	1,00 p=0,0008	1,00 p=0,0008	0,94 p=0,0033	
Cut-off	1,71	2,38	4,60	-	0,97	1,83	1,22	1,26	
Чувствительность	100,0%	100,0%	100,0%	-	75,0%	100,0%	100,0%	87,5%	
Специфичность	100,0%	100,0%	100,0%	-	87,5%	100,0%	100,0%	100,0%	
Правдоподобие	LR+=inf	LR+=inf	LR+=inf	-	LR+=6	LR+=inf	LR+=inf	LR+=inf	
Биомаркер	моноцитарный хемотаксический белок-1 в моче (пг/мг креатинина)								
AUC, p (точно: 4 знака)	1,00 p=0,0008	1,00 p=0,0008	1,00 p=0,0008	0,83 p=0,0274	1,00 p=0,0008	1,00 p=0,0008	1,00 p=0,0008	0,95 p=0,0023	
Cut-off	5,31	8,47	12,11	2,80	3,20	2,94	2,80	4,02	
Чувствительность	100,0%	100,0%	100,0%	62,5%	100,0%	100,0%	100,0%	87,5%	
Специфичность	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
Правдоподобие	LR+=inf	LR+=inf	LR+=inf	LR+=inf	LR+=inf	LR+=inf	LR+=inf	LR+=inf	
Биомаркер	креатинин в крови, мкмоль/л								
AUC, p (точно: 4 знака)	0,95 p=0,0023	1,00 p=0,0008	1,00 p=0,0008	0,48 p=0,9164	0,98 p=0,0011	0,98 p=0,0011	0,95 p=0,0023	0,84 p=0,0209	
Cut-off	66,97	103,35	161,65	-	76,63	77,63	76,63	66,87	
Чувствительность	100,0%	100,0%	100,0%	-	100,0%	100,0%	87,5%	87,5%	
Специфичность	75,0%	100,0%	100,0%	-	87,5%	87,5%	87,5%	75,0%	
Правдоподобие	LR+=4	LR+=inf	LR+=inf	-	LR+=8	LR+=8	LR+=7	LR+=3,5	

Примечание: AUC – площадь под ROC-кривой, Cut-off – пороговый уровень, LR – коэффициент правдоподобия положительного результата, inf – бесконечность, p – уровень значимости, прочерк – данные не рассчитывались на основании низкого уровня AUC

Исследование связи раннего повышения мочевой экскреции тканевого полипептидного антигена, представляющего собой растворимые фрагменты цитокератинов СК 8/18 и 19, с уровнем индуцированного апоптоза показало положительную корреляцию и отсутствие связи между концентрацией показателя в моче и риском наступления смертельного исхода, обусловленного распространённым некрозом канальцев. Сравнительный анализ взаимосвязи уровней α -ТРА и Kim-1 в моче выявил положительные корреляции Спирмена в парах α -ТРА/креатинин – апоптоз ($r_s=0,73$ (95% ДИ 0,45–0,88), $p<0,0001$), α -Kim-1/креатинин – некроз ($r_s=0,98$ (95% ДИ 0,96–0,99), $p<0,0001$). Изучение кривых функции риска показало, что только креатинин крови ($p=0,0002$) и Kim-1/креатинин мочи ($p=0,0005$) имели значимый уровень связи со смертностью крыс.

Результаты корреляционного анализа взаимосвязи биомаркеров нефротоксичности и морфологическими признаками по шкале EGPI на модели отравления типовым нефротоксином уранил ацетатом представлены в таблицах 15-24.

Патогенез ОПП токсического генеза по результатам применения трёхточечного кинетического подхода измерения уровня биомаркеров как метода диагностики токсической нефропатии может иметь следующую последовательность: в почке создаётся высокая концентрация яда на этапе распределения, реабсорбции и элиминации (токсикокинетики); воздействие токсиканта на сосудистый и тубулоинтерстициальный компоненты нефронов приводит к их первичному повреждению и гибели по пути дистрофических изменений, апоптоза и некроза. Первичное повреждение характеризуется ранними дистрофическими изменениями, запуском каскада «сигнальных» реакций, повышением мобильности клеток и их отделения от базальной мембраны, апоптозом и дедифференцировкой, что выявляется по выделению с мочой фрагментов цитокератина 8,18 и 19 у отравленных крыс. В ответ на токсическое нарушение процессов реабсорбции в ПК активируется синтез в ДК мочевого липокалина-2 и его выделение с мочой. Нарастание числа повреждённых клеток сопровождается сверхэкспрессией Kim-1 и его выделения с мочой максимально на 3-и сутки, а превышение уровня более 8 нг/мл прогнозирует риск летального повреждения почек. Нарушение процессов реабсорбции белков в ПК нефронов сопровождается увеличением выделения с мочой RBP4 вследствие развития канальцевой дисфункции. В очаги некротической гибели клеток почечных канальцев интенсивно поступают моноциты, которые мигрируют в зону повреждённых канальцев и созревают до макрофагов, и активируют фибробласты, что сопровождается массивной продукцией MCP-1 также с 3-их суток, а затем TGF- β 1. Макрофаги усиливают первичное токсическое повреждение канальцев. Активация профибротических сигнальных путей и прогрессирование ОПП приводит к увеличению выделения с мочой TGF- β 1, достигающего максимальных значений на 7-е сутки после отравления (из сосудистого и тубулоинтерстициального компонентов нефронов).

Таким образом полученные результаты позволили установить, что для разработки диагностического алгоритма необходимо определить пороговый уровень анализов, используя в качестве инструментов кинетическое измерение биомаркеров и ROC-анализ. Нацеливание на максимальную чувствительность и специфичность позволяет установить пороговые значения, которые могут укладываться или могут выходить за пределы бисигмального распределения показателя у «здоровых» пациентов, не имеющих в анамнезе хронической болезни почек, так как предшествующая патология почек может сыграть существенную роль в развитии ОПП и оказать влияние на величину измеряемого аналита. В перечень маркеров «выбора» следует включать медиаторы дедифференцировки клеток, травмы/некроза почечных канальцев, активации моноцитов/макрофагов, а также функции почек.

При анализе парных корреляций Спирмена по всем временным точкам вместе (1-7 сутки) установлены следующие результаты: «креатинин крови-сумма баллов по шкале EGPI» $r_s = 0,949$ (95% ДИ 0,925–0,966), $p < 0,0001$; «u-ТРА-сумма баллов по шкале EGPI» $r_s = 0,909$ (95% ДИ 0,837–0,950), $p < 0,0001$; «u-Kim-1-сумма баллов по шкале EGPI» $r_s = 0,760$ (95% ДИ 0,595–0,864), $p < 0,0001$; «u-NGAL-сумма баллов по шкале EGPI» $r_s = 0,644$ (95% ДИ 0,392–0,806), $p < 0,0001$; «u-RBP4-сумма баллов по шкале EGPI» $r_s = 0,435$ (95% ДИ 0,114–0,674), $p = 0,0080$; «u-MCP-1-сумма баллов по шкале EGPI» $r_s = 0,490$ (95% ДИ 0,183–0,710), $p = 0,0024$; «u-TGF- β 1-сумма баллов по шкале EGPI» $r_s = 0,578$ (95% ДИ 0,298–0,766), $p = 0,0002$.

Высокие значения коэффициента корреляции между u-ТРА и степенью морфологических изменений ткани почек свидетельствуют о прогностической ценности биомаркера фрагментов цитокератина 8,18 и 19 в моче – возможности прогнозировать степень морфологических изменений, которые развиваются позже по увеличенному уровню u-ТРА в первые сутки отравления нефротоксичным соединением урана.

Выявленные положительные корреляции между маркерами позволяют исключать дублирующие друг друга тесты при создании мультиплексных панелей для упрощения самого анализа и интерпретации его результатов. Оценивая в целом полученные результаты, можно утверждать, что трёхточечное кинетическое определение уровня биомаркеров на ранней стадии регистрации в 1-3 сутки и в период ближайших последствий (7-е сутки) острого повреждения почек является высокочувствительным и специфичным новым подходом для диагностики токсических нефропатий.

Таблица 15 – Результаты применения корреляционного анализа Спирмена между ненормализованными к креатинину мочи маркерами и степенью повреждения почек, измеренной по шкале EGТI

Биомаркеры	День 1	День 3	День 7
u-TPA	$r_s = 0,533$ (95% ДИ -0,059–0,847), $p = 0,075$	$r_s = 0,440$ (95% ДИ -0,179–0,809), $p = 0,157$	$r_s = -0,388$ (95% ДИ -0,787–0,239), $p = 0,219$
u-NGAL	$r_s = -0,099$ (95% ДИ -0,637–0,503), $p = 0,765$	$r_s = 0,077$ (95% ДИ -0,520–0,623), $p = 0,818$	$r_s = -0,113$ (95% ДИ -0,645–0,493), $p = 0,734$
u-KIM-1	$r_s = 0,457$ (95% ДИ -0,159–0,817), $p = 0,139$	$r_s = 0,124$ (95% ДИ -0,484–0,652), $p = 0,708$	$r_s = 0,375$ (95% ДИ -0,253–0,781), $p = 0,237$
u-RBP4	$r_s = -0,090$ (95% ДИ -0,631–0,510), $p = 0,787$	$r_s = -0,004$ (95% ДИ -0,576–0,572), $p = 0,991$	$r_s = 0,125$ (95% ДИ -0,483–0,652), $p = 0,706$
u-MCP-1	$r_s = -0,039$ (95% ДИ -0,599–0,547), $p = 0,908$	$r_s = -0,117$ (95% ДИ -0,647–0,490), $p = 0,724$	$r_s = 0,522$ (95% ДИ -0,075–0,843), $p = 0,083$
u-TGF- β 1	$r_s = 0,216$ (95% ДИ -0,408–0,703), $p = 0,510$	$r_s = -0,025$ (95% ДИ -0,590–0,557), $p = 0,941$	$r_s = 0,582$ (95% ДИ 0,013–0,867), $p = 0,046^*$
s-Креатинин	$r_s = 0,110$ (95% ДИ -0,495–0,643), $p = 0,740$	$r_s = 0,187$ (95% ДИ -0,434–0,687), $p = 0,571$	$r_s = 0,390$ (95% ДИ -0,370–0,837), $p = 0,313$

Примечание: * результаты статистически значимы на уровне $p < 0,05$

Таблица 16 – Результаты применения корреляционного анализа Спирмена между маркерами у «здоровых» животных

Биомаркеры	u-NGAL	u-KIM-1	u-RBP4	u-MCP-1	u-TGF-β1	s-Креатинин
u-TPA	$r_s = 0,441$ (95% ДИ -0,178–0,810), $p = 0,155$	$r_s = 0,168$ (95% ДИ -0,450–0,676), $p = 0,612$	$r_s = -0,324$ (95% ДИ -0,757–0,307), $p = 0,314$	$r_s = 0,197$ (95% ДИ -0,425–0,693), $p = 0,549$	$r_s = 0,272$ (95% ДИ -0,357–0,732), $p = 0,402$	$r_s = 0,316$ (95% ДИ -0,315–0,753), $p = 0,327$
u-NGAL	-	$r_s = 0,329$ (95% ДИ -0,302–0,760), $p = 0,305$	$r_s = 0,193$ (95% ДИ -0,428–0,690), $p = 0,558$	$r_s = 0,099$ (95% ДИ -0,504–0,636), $p = 0,767$	$r_s = -0,049$ (95% ДИ -0,606–0,540), $p = 0,882$	$r_s = 0,333$ (95% ДИ -0,298–0,761), $p = 0,299$
u-KIM-1	-	-	$r_s = -0,100$ (95% ДИ -0,637–0,503), $p = 0,763$	$r_s = -0,208$ (95% ДИ -0,699–0,415), $p = 0,526$	$r_s = 0,395$ (95% ДИ -0,231–0,790), $p = 0,210$	$r_s = 0,442$ (95% ДИ -0,177–0,810), $p = 0,154$
u-RBP4	-	-	-	$r_s = 0,407$ (95% ДИ -0,218–0,795), $p = 0,196$	$r_s = -0,579$ (95% ДИ -0,865–0,008), $p = 0,051$	$r_s = -0,066$ (95% ДИ -0,617–0,528), $p = 0,842$
u-MCP-1	-	-	-	-	$r_s = -0,213$ (95% ДИ -0,701–0,411), $p = 0,517$	$r_s = 0,102$ (95% ДИ -0,501–0,639), $p = 0,758$
u-TGF-β1	-	-	-	-	-	$r_s = 0,236$ (95% ДИ -0,391–0,713), $p = 0,470$

Таблица 17 – Результаты применения корреляционного анализа Спирмена между маркерами на 1 день отравления УАД

Биомаркеры	u-NGAL	u-KIM-1	u-RBP4	u-MCP-1	u-TGF- β 1	s-Креатинин
u-TPA	$r_s = 0,011$ (95% ДИ -0,567–0,581), $p = 0,975$	$r_s = 0,31$ (95% ДИ -0,321–0,750), $p = 0,336$	$r_s = 0,374$ (95% ДИ -0,255–0,780), $p = 0,239$	$r_s = -0,118$ (95% ДИ -0,648–0,489), $p = 0,722$	$r_s = -0,123$ (95% ДИ -0,651–0,485), $p = 0,712$	$r_s = -0,112$ (95% ДИ -0,645–0,493), $p = 0,735$
u-NGAL	-	$r_s = -0,067$ (95% ДИ -0,617–0,527), $p = 0,840$	$r_s = 0,036$ (95% ДИ -0,549–0,597), $p = 0,914$	$r_s = -0,476$ (95% ДИ -0,825–0,135), $p = 0,120$	$r_s = 0,002$ (95% ДИ -0,573–0,575), $p = 0,996$	$r_s = -0,423$ (95% ДИ -0,802–0,199), $p = 0,175$
u-KIM-1	-	-	$r_s = 0,348$ (95% ДИ -0,283–0,768), $p = 0,276$	$r_s = 0,101$ (95% ДИ -0,502–0,638), $p = 0,762$	$r_s = -0,131$ (95% ДИ -0,655–0,479), $p = 0,694$	$r_s = -0,124$ (95% ДИ -0,651–0,485), $p = 0,709$
u-RBP4	-	-	-	$r_s = 0,251$ (95% ДИ -0,377–0,721), $p = 0,442$	$r_s = -0,150$ (95% ДИ -0,666–0,464), $p = 0,651$	$r_s = -0,073$ (95% ДИ -0,621–0,523), $p = 0,826$
u-MCP-1	-	-	-	-	$r_s = -0,043$ (95% ДИ -0,602–0,544), $p = 0,897$	$r_s = 0,554$ (95% ДИ -0,029–0,856), $p = 0,061$
u-TGF- β 1	-	-	-	-	-	$r_s = -0,095$ (95% ДИ -0,634–0,507), $p = 0,775$

Таблица 18 – Результаты применения корреляционного анализа Спирмена между маркерами на 3 день отравления УАД

Биомаркеры	u-NGAL	u-KIM-1	u-RBP4	u-MCP-1	u-TGF-β1	s-Креатинин
u-TPA	$r_s = -0,298$ (95% ДИ -0,745–0,333), $p = 0,356$	$r_s = 0,664$ (95% ДИ 0,146–0,896), $p = 0,016^*$	$r_s = 0,165$ (95% ДИ -0,452–0,675), $p = 0,618$	$r_s = 0,336$ (95% ДИ -0,295–0,763), $p = 0,295$	$r_s = 0,657$ (95% ДИ 0,134–0,894), $p = 0,018^*$	$r_s = 0,074$ (95% ДИ -0,522–0,621), $p = 0,825$
u-NGAL	-	$r_s = -0,130$ (95% ДИ -0,655–0,480), $p = 0,695$	$r_s = 0,288$ (95% ДИ -0,342–0,74), $p = 0,373$	$r_s = -0,175$ (95% ДИ -0,681–0,443), $p = 0,595$	$r_s = -0,253$ (95% ДИ -0,722–0,376), $p = 0,438$	$r_s = 0,610$ (95% ДИ 0,055–0,877), $p = 0,033^*$
u-KIM-1	-	-	$r_s = 0,13$ (95% ДИ -0,48–0,655), $p = 0,696$	$r_s = 0,231$ (95% ДИ -0,396–0,711), $p = 0,481$	$r_s = 0,804$ (95% ДИ 0,428–0,943), $p = 0,001^*$	$r_s = 0,207$ (95% ДИ -0,417–0,698), $p = 0,529$
u-RBP4	-	-	-	$r_s = 0,350$ (95% ДИ -0,280–0,769), $p = 0,272$	$r_s = 0,214$ (95% ДИ -0,411–0,702), $p = 0,515$	$r_s = 0,477$ (95% ДИ -0,133–0,825), $p = 0,119$
u-MCP-1	-	-	-	-	$r_s = 0,727$ (95% ДИ 0,263–0,918), $p = 0,006^*$	$r_s = 0,053$ (95% ДИ -0,538–0,608), $p = 0,875$
u-TGF-β1	-	-	-	-	-	$r_s = 0,144$ (95% ДИ -0,469–0,663), $p = 0,664$

Примечание: * результаты статистически значимы на уровне $p < 0,05$

Таблица 19 – Результаты применения корреляционного анализа Спирмена между маркерами на 7 день отравления УАД

Биомаркеры	u-NGAL	u-KIM-1	u-RBP4	u-MCP-1	u-TGF-β1	s-Креатинин
u-TPA	$r_s = -0,040$ (95% ДИ - 0,600–0,546), $p = 0,903$	$r_s = -0,429$ (95% ДИ -0,805– 0,192), $p = 0,169$	$r_s = 0,002$ (95% ДИ -0,573– 0,575), $p = 0,996$	$r_s = -0,678$ (95% ДИ -0,901– 0,171), $p = 0,013^*$	$r_s = 0,112$ (95% ДИ -0,493– 0,645), $p = 0,735$	$r_s = -0,184$ (95% ДИ -0,756– 0,547), $p = 0,648$
u-NGAL	-	$r_s = 0,315$ (95% ДИ -0,316– 0,753), $p = 0,328$	$r_s = -0,070$ (95% ДИ -0,619– 0,525), $p = 0,833$	$r_s = 0,354$ (95% ДИ -0,276– 0,771), $p = 0,267$	$r_s = 0,249$ (95% ДИ -0,379– 0,720), $p = 0,446$	$r_s = -0,042$ (95% ДИ -0,687– 0,64), $p = 0,918$
u-KIM-1	-	-	$r_s = -0,011$ (95% ДИ -0,581– 0,567), $p = 0,975$	$r_s = 0,748$ (95% ДИ 0,306– 0,925), $p = 0,004^*$	$r_s = 0,084$ (95% ДИ -0,515– 0,628), $p = 0,801$	$r_s = 0,117$ (95% ДИ -0,593– 0,725), $p = 0,774$
u-RBP4	-	-	-	$r_s = -0,179$ (95% ДИ -0,683– 0,440), $p = 0,588$	$r_s = 0,287$ (95% ДИ -0,343– 0,739), $p = 0,375$	$r_s = -0,317$ (95% ДИ -0,810– 0,440), $p = 0,422$
u-MCP-1	-	-	-	-	$r_s = 0,189$ (95% ДИ -0,432– 0,688), $p = 0,566$	$r_s = 0,317$ (95% ДИ -0,440– 0,810), $p = 0,422$
u-TGF-β1	-	-	-	-	-	$r_s = 0,467$ (95% ДИ -0,286– 0,863), $p = 0,215$

Примечание: * результаты статистически значимы на уровне $p < 0,05$

Таблица 20 – Результаты применения корреляционного анализа Спирмена между степенью повреждения, измеренной по шкале EGPI, и нормализованными по креатинину маркерами (сравнение «день в день»)

Биомаркеры	День 1	День 3	День 7
u-ТРА/креатинин	$r_s = 0,576$ (95% ДИ 0,003–0,864), $p = 0,049^*$	$r_s = 0,394$ (95% ДИ -0,233–0,789), $p = 0,212$	$r_s = -0,352$ (95% ДИ -0,771–0,278), $p = 0,269$
u-NGAL/креатинин	$r_s = -0,025$ (95% ДИ -0,591–0,557), $p = 0,940$	$r_s = 0,014$ (95% ДИ -0,564–0,583), $p = 0,966$	$r_s = -0,257$ (95% ДИ -0,724–0,372), $p = 0,430$
u-KIM-1/креатинин	$r_s = 0,431$ (95% ДИ -0,190–0,806), $p = 0,166$	$r_s = 0,124$ (95% ДИ -0,484–0,652), $p = 0,708$	$r_s = 0,271$ (95% ДИ -0,358–0,731), $p = 0,403$
u-RBP4/креатинин	$r_s = -0,057$ (95% ДИ -0,611–0,535), $p = 0,865$	$r_s = 0,074$ (95% ДИ -0,522–0,622), $p = 0,823$	$r_s = 0,186$ (95% ДИ -0,434–0,686), $p = 0,573$
u-MCP-1/креатинин	$r_s = 0,009$ (95% ДИ -0,568–0,58), $p = 0,978$	$r_s = -0,174$ (95% ДИ -0,680–0,444), $p = 0,598$	$r_s = 0,536$ (95% ДИ -0,055–0,849), $p = 0,073$
u-TGF- β 1/креатинин	$r_s = 0,166$ (95% ДИ -0,451–0,675), $p = 0,616$	$r_s = -0,025$ (95% ДИ -0,59–0,557), $p = 0,941$	$r_s = 0,411$ (95% ДИ -0,213–0,797), $p = 0,190$

Примечание: * результаты статистически значимы на уровне $p < 0,05$

Таблица 21 – Результаты применения корреляционного анализа Спирмена между нормализованными по креатинину маркерами у «здоровых» животных

Биомаркеры	u-NGAL /креатинин	u-KIM-1 /креатинин	u-RBP4 /креатинин	u-MCP-1 /креатинин	u-TGF- β 1 /креатинин
u-TPA /креатинин	$r_s = 0,456$ (95% ДИ -0,160– 0,816), $p = 0,140$	$r_s = 0,096$ (95% ДИ -0,506– 0,635), $p = 0,772$	$r_s = -0,303$ (95% ДИ -0,747– 0,328), $p = 0,349$	$r_s = 0,197$ (95% ДИ -0,425– 0,693), $p = 0,549$	$r_s = 0,272$ (95% ДИ -0,357– 0,732), $p = 0,402$
u-NGAL /креатинин	-	$r_s = 0,350$ (95% ДИ -0,280– 0,769), $p = 0,272$	$r_s = 0,064$ (95% ДИ -0,529– 0,615), $p = 0,847$	$r_s = 0,056$ (95% ДИ -0,535– 0,611), $p = 0,866$	$r_s = 0,063$ (95% ДИ -0,530– 0,615), $p = 0,849$
u-KIM-1 /креатинин	-	-	$r_s = -0,144$ (95% ДИ -0,663– 0,468), $p = 0,663$	$r_s = -0,236$ (95% ДИ -0,713– 0,391), $p = 0,470$	$r_s = 0,353$ (95% ДИ -0,277– 0,771), $p = 0,269$
u-RBP4 /креатинин	-	-	-	$r_s = 0,470$ (95% ДИ -0,143– 0,822), $p = 0,126$	$r_s = -0,491$ (95% ДИ -0,831– 0,115), $p = 0,107$
u-MCP-1 /креатинин	-	-	-	-	$r_s = -0,213$ (95% ДИ -0,701– 0,411), $p = 0,517$

Таблица 22 – Результаты применения корреляционного анализа Спирмена между нормализованными по креатинину маркерами на 1 день отравления УАД (сравнение «день в день»)

Биомаркеры	u-NGAL /креатинин	u-KIM-1 /креатинин	u-RBP4 /креатинин	u-MCP-1 /креатинин	u-TGF-β1 /креатинин
u-TPA /креатинин	$r_s = 0,238$ (95% ДИ -0,389– 0,714), $p = 0,467$	$r_s = 0,359$ (95% ДИ -0,27–0,774), $p = 0,259$	$r_s = 0,310$ (95% ДИ -0,321– 0,750), $p = 0,337$	$r_s = -0,125$ (95% ДИ -0,652– 0,484), $p = 0,707$	$r_s = 0,032$ (95% ДИ -0,552– 0,595), $p = 0,925$
u-NGAL /креатинин	-	$r_s = -0,254$ (95% ДИ -0,722–0,375), $p = 0,437$	$r_s = -0,089$ (95% ДИ -0,631– 0,511), $p = 0,789$	$r_s = -0,427$ (95% ДИ -0,804– 0,194), $p = 0,171$	$r_s = 0,126$ (95% ДИ -0,483– 0,653), $p = 0,704$
u-KIM-1 /креатинин	-	-	$r_s = 0,290$ (95% ДИ -0,340– 0,741), $p = 0,370$	$r_s = -0,025$ (95% ДИ -0,590– 0,557), $p = 0,940$	$r_s = -0,109$ (95% ДИ -0,643– 0,496), $p = 0,742$
u-RBP4 /креатинин	-	-	-	$r_s = 0,185$ (95% ДИ -0,435– 0,686), $p = 0,575$	$r_s = -0,111$ (95% ДИ -0,644– 0,495), $p = 0,739$
u-MCP-1 /креатинин	-	-	-	-	$r_s = 0,041$ (95% ДИ -0,546– 0,601), $p = 0,902$

Таблица 23 – Результаты применения корреляционного анализа Спирмена между нормализованными по креатинину маркерами на 3 день отравления УАД (сравнение «день в день»)

Биомаркеры	u-NGAL /креатинин	u-KIM-1 /креатинин	u-RBP4 /креатинин	u-MCP-1 /креатинин	u-TGF-β1 /креатинин
u-TPA /креатинин	$r_s = 0,042$ (95% ДИ -0,545– 0,601), $p = 0,900$	$r_s = 0,741$ (95% ДИ 0,291– 0,923), $p = 0,004^*$	$r_s = 0,476$ (95% ДИ -0,135– 0,824), $p = 0,121$	$r_s = 0,490$ (95% ДИ -0,117– 0,83), $p = 0,108$	$r_s = 0,706$ (95% ДИ 0,223–0,911), $p = 0,008^*$
u-NGAL /креатинин	-	$r_s = 0,084$ (95% ДИ -0,515– 0,628), $p = 0,801$	$r_s = 0,357$ (95% ДИ -0,273– 0,772), $p = 0,263$	$r_s = 0,238$ (95% ДИ -0,389– 0,714), $p = 0,467$	$r_s = 0,105$ (95% ДИ -0,499–0,64), $p = 0,752$
u-KIM-1 /креатинин	-	-	$r_s = 0,336$ (95% ДИ -0,295– 0,763), $p = 0,295$	$r_s = 0,385$ (95% ДИ -0,243– 0,785), $p = 0,224$	$r_s = 0,783$ (95% ДИ 0,38–0,936), $p = 0,002^*$
u-RBP4 /креатинин	-	-	-	$r_s = 0,406$ (95% ДИ - 0,219–0,795), $p = 0,197$	$r_s = 0,434$ (95% ДИ -0,187– 0,807), $p = 0,164$
u-MCP-1 /креатинин	-	-	-	-	$r_s = 0,825$ (95% ДИ 0,477–0,949), $p = 0,000^*$

Примечание: * результаты статистически значимы на уровне $p < 0,05$

Таблица 24 – Результаты применения корреляционного анализа Спирмена между нормализованными по креатинину маркерами на 7 день отравления УАД (сравнение «день в день»)

Биомаркеры	u-NGAL /креатинин	u-KIM-1 /креатинин	u-RBP4 /креатинин	u-MCP-1 /креатинин	u-TGF-β1 /креатинин
u-TPA /креатинин	$r_s = 0,196$ (95% ДИ -0,426– 0,692), $p = 0,551$	$r_s = -0,105$ (95% ДИ -0,640– 0,499), $p = 0,752$	$r_s = 0,270$ (95% ДИ -0,360– 0,731), $p = 0,407$	$r_s = -0,564$ (95% ДИ -0,860– 0,015), $p = 0,055$	$r_s = 0,441$ (95% ДИ -0,178–0,810), $p = 0,155$
u-NGAL /креатинин	-	$r_s = 0,322$ (95% ДИ -0,309– 0,756), $p = 0,317$	$r_s = -0,091$ (95% ДИ -0,632– 0,510), $p = 0,784$	$r_s = 0,077$ (95% ДИ -0,520– 0,623), $p = 0,817$	$r_s = 0,203$ (95% ДИ -0,420–0,696), $p = 0,537$
u-KIM-1 /креатинин	-	-	$r_s = -0,140$ (95% ДИ -0,661– 0,472), $p = 0,673$	$r_s = 0,629$ (95% ДИ 0,087–0,884), $p = 0,026^*$	$r_s = 0,070$ (95% ДИ -0,525–0,619), $p = 0,834$
u-RBP4 /креатинин	-	-	-	$r_s = -0,322$ (95% ДИ -0,756– 0,309), $p = 0,317$	$r_s = 0,315$ (95% ДИ -0,316–0,753), $p = 0,328$
u-MCP-1 /креатинин	-	-	-	-	$r_s = 0,063$ (95% ДИ -0,530–0,615), $p = 0,850$

Примечание: * результаты статистически значимы на уровне $p < 0,05$

3.2 Функциональные изменения почек в диагностике токсических нефропатий

Были выявлены как общие однотипные диагностически значимые функциональные изменения, так и особенности влияния каждого нефротоксина. Специфические кристаллы-метаболиты были выявлены при отравлении этиленгликолем и сульфаниламидными препаратами в моче и ткани почек. Для оценки частоты встречаемости клинических проявлений нефропатии вследствие отравления различными нефротоксинами и лекарственными средствами с нефротоксическим потенциалом, а также сравнения профиля токсического действия на функции почек оценивали следующие параметры (Рисунки 24-33, таблица 25): изменение массы тела, нарушение акваретической функции почек, снижение уровня креатинина в моче, протеинурия, энзимурия из проксимальных (ПК) или дистальных канальцев и собирательных трубочек (ДК и СТ), клетки почечного эпителия (Рисунки 25-27), лейкоцитурия, гематурия, цилиндрурия, увеличение трансубулярного калиевого градиента (ТТКГ), снижение концентрационного индекса по осмолярности, величины максимальной реабсорбции воды (Рисунок 29).

Явных клинических проявлений поражения почек в ранние сроки осмотра животных не было зарегистрировано, масса тела не увеличивалась (отеки) и не снижалась при действии большинства токсинов, за исключением отравлений хромом и ураном. Доминирующими проявлениями токсической нефропатии при действии большинства токсинов были нарушения акваретической функции – начальная полиурия, снижение плотности мочи, энзимурия из канальцев, лейкоцитурия и цилиндрурия, выявляемыми исключительно лабораторными методами. У части особей высокочувствительных крыс диурез исчезал полностью в первые 24 часа, эти особи быстро погибали от терминальной азотемии, гиперкалиемии и гипермагниемии. Нарастание уровня продуктов катаболического обмена белков, электролитов в крови и невозможность их удаления поражёнными почками приводили к появлению неврологического дефицита, свойственного дисэлектролитемиям и уремической энцефалопатии.

Применение техники автоматического и ручного варианта подсчёта клеток в осадках мочи позволяло устанавливать степень деструктивных процессов в почечной паренхиме. Автоматический метод (анализатор FluidlabIVET) вычислял количество клеточных элементов без окрашивания в нативной несконцентрированной моче (Рисунок 27). Ручной вариант микроскопического анализа выявлял все клеточные элементы осадка. Почечный эпителий характеризовался эксцентрическим расположением ядра, овальной или кубовидной формой клеток размером 8-10 мкм с гранулярной цитоплазмой или жировыми вакуолями (Рисунок 25 Г).

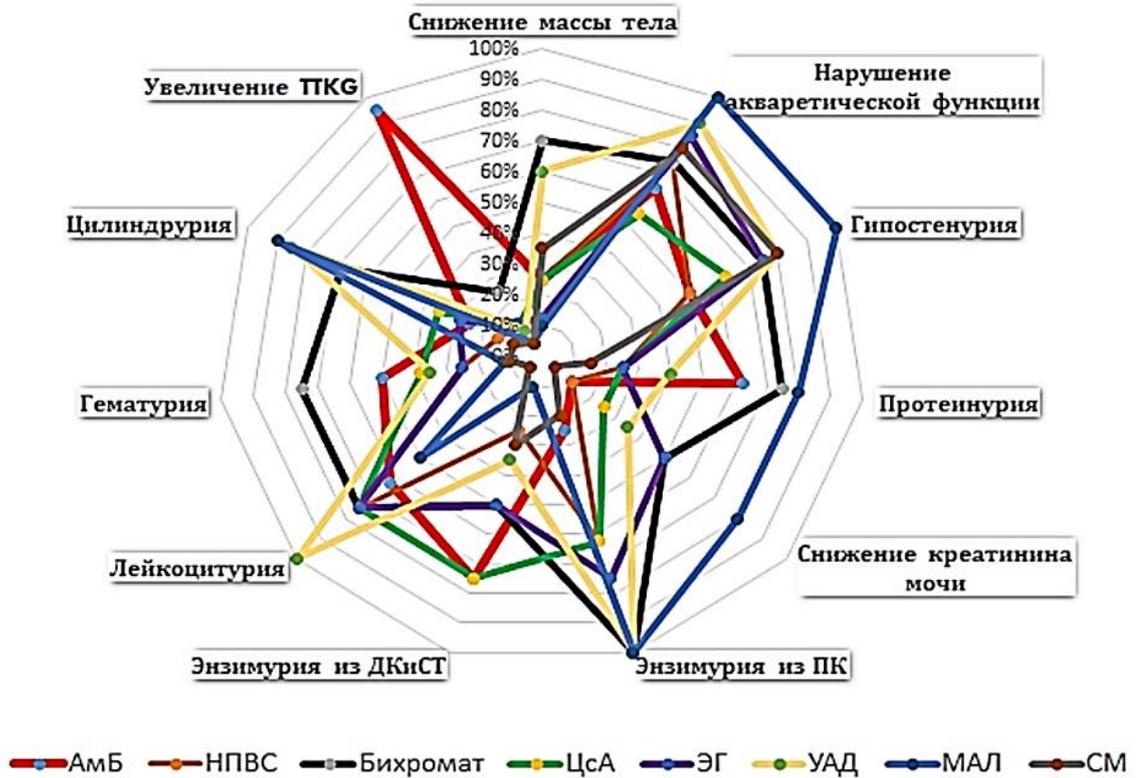


Рисунок 24 – «Паутинная» диаграмма распределения клинико-лабораторных признаков токсической нефропатии у крыс при моделировании отравлений различными нефротоксинами (% животных из группы с признаками). Обозначения: АмБ – амфотерицин Б, НПВС – нестероидные противовоспалительные средства, ЦсА – циклоспорин А, ЭГ – этиленгликоль, УАД – уранил ацетат дигидрат, МАЛ – малеат натрия, СМ – сульфаниламидные препараты.

Было установлено, что при введении амфотерицина Б происходит трехкратное снижение осмоляльности мочи (таблица 25) вследствие повреждения преимущественно ДК и СТ. При введении других веществ, поражающих главным образом ПК, снижение осмоляльности мочи не было статически значимым или имело характер тенденции. При введении цисплатина и оценке осмоляльности через 1 месяц была заметна биохимическая и физиологическая адаптация почек к концентрированию мочи, несмотря на поражение ДК и СТ – их атрофическую и кистозную трансформацию. Достоверное снижение скорости клубочковой фильтрации было выявлено при отравлении цисплатином, экстрактом Паутинника и этиленгликолем. Для амфотерицина Б снижение СКФ имело характер тенденции.

У человека при осмоляльности мочи менее 350 мОсм/кг, концентрации натрия в моче – более 40 ммоль/л, соотношении мочевины в моче/плазме менее 3 и креатинина менее 20

предполагают развитие острого некроза канальцев – тубулонекротического варианта острого повреждения почек. В норме осмоляльность мочи и её плотность линейно коррелированы и свидетельствуют о функциях мозгового слоя почки: дистальных канальцев и собирательных трубочек нефронов, а также интерстициальной ткани. При отравлении ЭГ статистически достоверное снижение осмоляльности мочи отмечали на 3 и 7 сутки у самцов крыс с достоверным восстановлением на 65 сутки (Рисунок 28), что отличалось на 7 сутки от такового при отравлении самок крыс (таблица 25). Выявленные половые различия были ограничены одним временным интервалом, в тоже время к нефротоксическому действию аминогликозида гентамицина сульфата чувствительность самцов и самок была одинаковой. Под действием трисульфона (сульфаниламида) снижение КИ по осмолярности и величины реабсорбции воды (Рисунок 29) могло быть обусловлено ингибированием фермента карбоангидразы, так как патологических изменений осадка мочи не выявлялось.

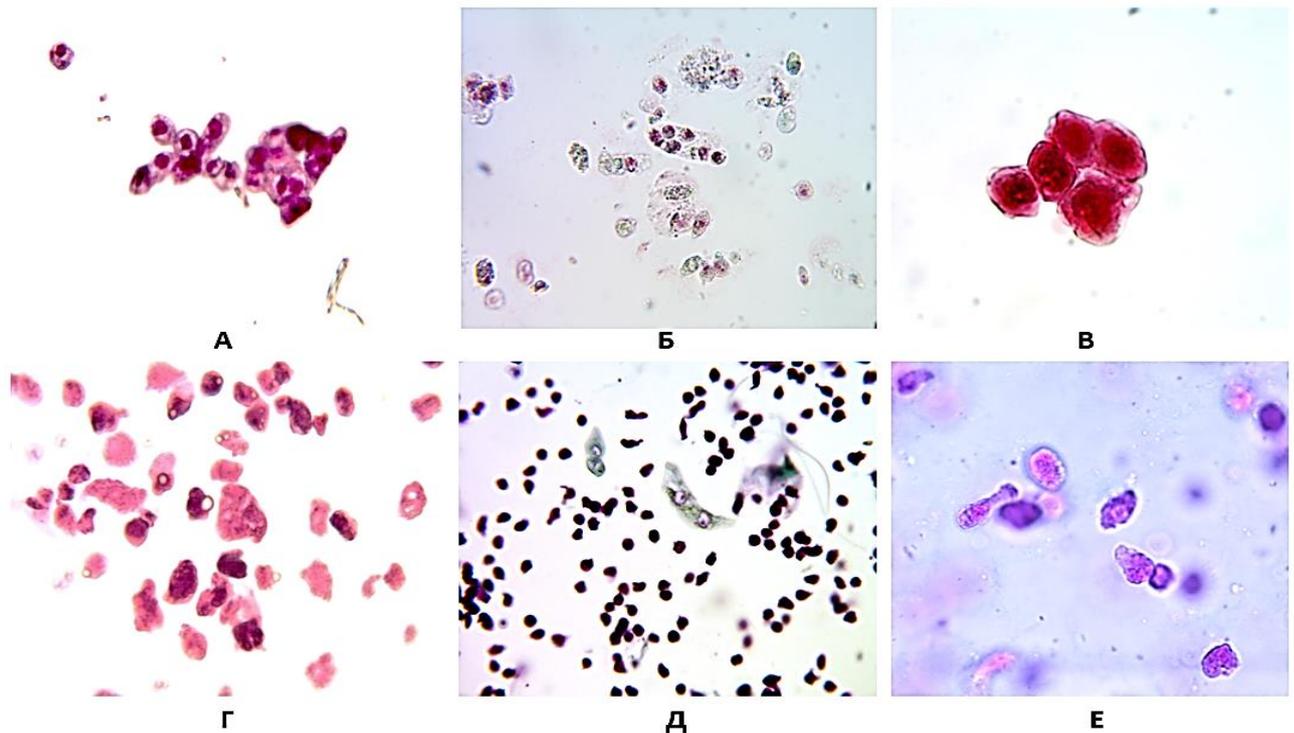


Рисунок 25 – Варианты почечного эпителия (Г – уранил ацетат, Е – этиленгликоль), пласт его клеток (А – амфотерицин Б, В – циклофосфамид), зернистые цилиндры (Б – гентамицин), лейкоциты (Д – сулема) в осадке мочи крыс с токсической нефропатией.

Суправитальная окраска. Увеличение 400.

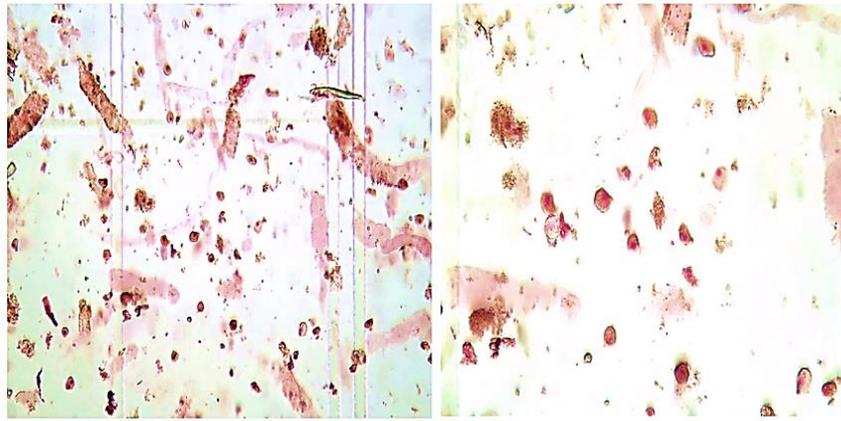


Рисунок 26 – Осадок мочи крысы самки с токсической нефропатией (бихромат калия). Слпки канальцев (цилиндры – слева), почечный эпителий и лейкоциты в стадии лизиса (справа).

Суправитальная окраска. Увеличение 100 (слева) и 400 (справа).

<p>Номер 7 Крыса самка Свободный забор мочи Жёлтая Мутноватая Плотность 1,032 г/мл RBC 28 кл/мкл WBC 9 кл/мкл SEC 8 кл/мкл nSEC 255 кл/мкл Гиал.цилиндры >2 Эпител.цилиндры >2 Соли неидент.крист.</p>	
--	--

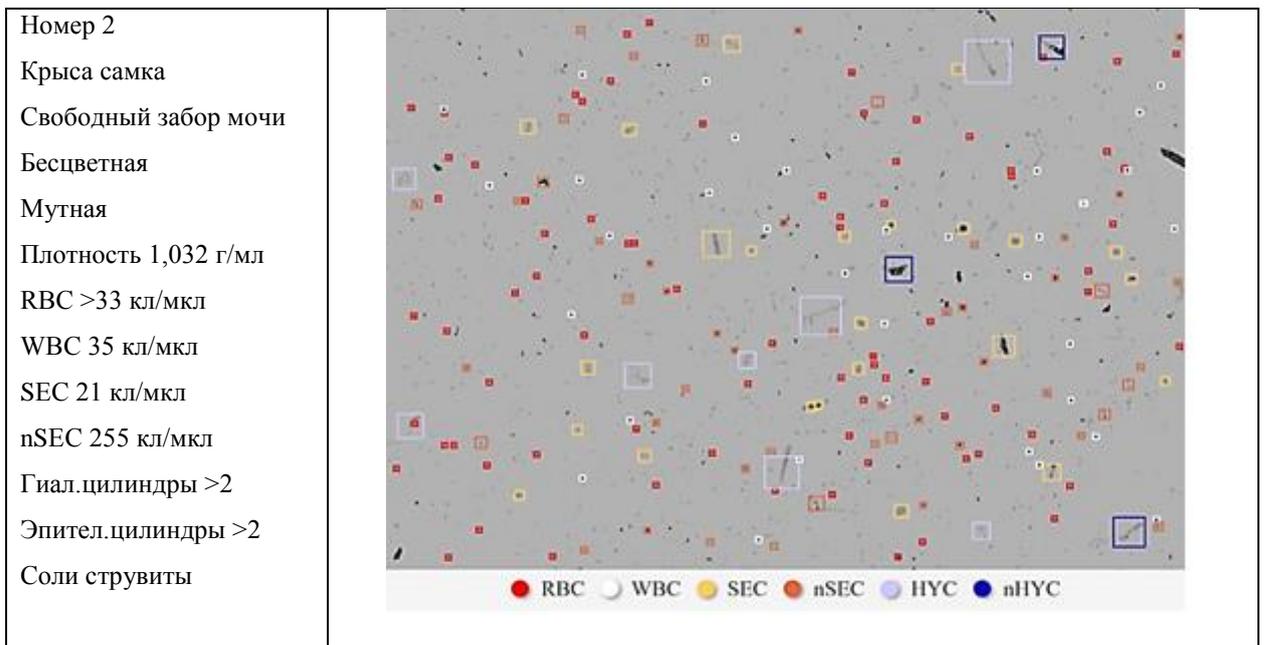


Рисунок 27 – Протокол микроскопии осадка мочи крыс с токсической нефропатией. RBC – эритроциты, WBC – лейкоциты, SEC – плоский эпителий, nSEC – переходный и почечный эпителий, HUC – гиалиновые цилиндры, nHUC – негиалиновые цилиндры.

При прогрессировании почечной недостаточности при постоянном потреблении растворенных веществ уменьшающееся количество функционирующих нефронов должно выделять увеличивающуюся долю отфильтрованной нагрузки растворенных веществ, и остаточные нефроны, в результате, подвержены значительному осмотическому диурезу и потере натрия. Поэтому потеря способности к концентрированию мочи – функции дистальных канальцев и собирательной системы – является ранней универсальной реакцией почек при ОПН, хотя дефект развивается в проксимальных канальцах. Для проверки наличия связи между осмоляльностью мочи и высотой нефротелия у крыс при моделировании токсических нефропатий применялся корреляционный анализ. Показатели в группе патологии были нормально распределены, а связь линейна и отсутствовали выбросы, поэтому применялся анализ Пирсона. Была установлена статистически значимая положительная связь между показателями на модели токсической нефропатии, вызванной УАД, $r=0,843$ (95% ДИ 0,666–0,930), $p<0,0001$ и отсутствие связи у «здоровых» животных (Рисунок 30). Токсическая нефропатия, вызванная солями урана (1-7 сут) и малеатом натрия (3 сут), сопровождалась достоверным ростом фракционной экскреции натрия с мочой крыс вследствие нарушения реабсорбции катионов и поражения транспортёров натрия в канальцевом эпителии (Рисунок 31). Другие нефротоксины в меньшей степени влияли на величину $FE-Na^+$.

Таблица 25 – Влияние некоторых лекарственных препаратов и ядов на величину минутного диуреза, осмоляльности мочи и скорость клубочковой фильтрации у крыс самок (Mean±SEM)

Группы животных / вещество	Нефротоксичное	Скорость диуреза, мкл/мин/кг	Осмоляльность мочи, мОсм/кг	р
Интактные крысы, n=10		30,4±2,5	1387,0±91,0	-
Трисульфон, 1500 мг/кг × 1; 3 сут, n=12		76,2±10,2	760,8±206,4	>0,05
Целекоксиб, 2000 мг/кг × 1; 3 сут, n=4		79,4±54,6	426,6±136,5	>0,05
Амфотерицин Б, 15 мг/кг × 1; 3 сут, n=20		69,6±7,8	391,2±67,9	< 0,0001
Пефлоксацин, 260 мг/кг × 3; 3 сут, n=4		62,3±22,8	890,0±595,2	>0,05
Ацикловир, 215 мг/кг × 3; 3 сут, n=4		84,1±20,7	401,3±95,7	>0,05
Амброксол, 85 мг/кг × 3; 3 сут, n=4		61,0±16,1	864,7±372,9	>0,05
Циклоспорин А, 50 мг/кг × 1; 3 сут, n=16		63,5±8,6	831,0±108,5	>0,05
Цисплатин, 2 мг/кг × 1,3,5 сут, 1 мес, n=20		50,3±5,4	1106,0±141,7	>0,05
Темефос, 2000 мг/кг × 1; 1 сут, n=6		83,2±16,1	510,3±182,2	>0,05
Экстракт Паутинника, 1 мл/кг × 1; 7 сут, n=11		54,9±18,4	884,6±132,1	>0,05
Этиленгликоль, 6 мл/кг × 1; 7 сут, n=22		88,4±16,4	863,1±121,3	>0,05
Группы животных / вещество	Нефротоксичное	СКФ, мл/мин	СКФ, %	р
Интактные крысы, n=10		3,06±0,20	100,1±6,6	-
Трисульфон, 1500 мг/кг × 1; 3 сут, n=12		2,25±0,31	73,5±10,1	>0,05
Целекоксиб, 2000 мг/кг × 1; 3 сут, n=4		2,05±0,91	66,9±29,6	>0,05
Амфотерицин Б, 15 мг/кг × 1; 3 сут, n=20		1,72±0,22	56,1±7,3	0,0564
Пефлоксацин, 260 мг/кг × 3; 3 сут, n=4		1,58±0,40	51,6±13,0	>0,05
Ацикловир, 215 мг/кг × 3; 3 сут, n=4		1,84±0,43	60,1±14,0	>0,05
Амброксол, 85 мг/кг × 3; 3 сут, n=4		1,81±0,50	59,0±16,3	>0,05
Циклоспорин А, 50 мг/кг × 1; 3 сут, n=16		1,89±0,22	61,8±7,1	>0,05
Цисплатин, 2 мг/кг × 1,3,5 сут, 1 мес, n=20		1,59±0,18	52,1±5,9	0,0091
Темефос, 2000 мг/кг × 1; 1 сут, n=6		2,09±0,26	68,4±8,6	>0,05
Экстракт Паутинника, 1 мл/кг × 1; 7 сут, n=11		1,41±0,30	46,0±9,9	0,0030
Этиленгликоль, 6 мл/кг × 1; 7 сут, n=22		1,71±0,22	55,7±7,2	0,0442

Основным источником для получения энергии в норме в клетках ПК нефронов является процесс β -окисления жирных кислот. При ОПП ишемического и токсического генеза из-за гипоксии и митохондриальной дисфункции метаболический процесс смещается в сторону гликолиза, который действует как компенсационный путь синтеза АТФ, но способствует переходу ОПП в ХБП. Нами было установлено, что содержание АТФ в гомогенатах коркового слоя почек крыс с токсической нефропатией существенно снижалось по сравнению с контрольными животными, что свидетельствовало о развитии прогрессирующего энергодефицита (Рисунок 32). Так, при отравлении УАД у крыс достигающее максимального уменьшение уровня АТФ отмечали к 7 суткам. При отравлении этиленгликолем энергодефицит прогрессировал от 1 к 3 суткам, а при введении крысам малеата натрия и амфотерицина Б регистрировался только в 1 (МАЛ) или 3 (АмБ) сутки. АТФ-зависимые процессы апоптоза клеток

активируются при снижении уровня АТФ в почке до 50-25% от контрольных значений, а при снижении уровня ниже 15% наступает некротическая гибель клеток. Калийпеническое состояние отмечали при токсической нефропатии, вызванной амфотерицином Б – величина трансбубулярного калиевого градиента увеличивалась достоверно по сравнению с другими нефротоксинами (Рисунок 33).

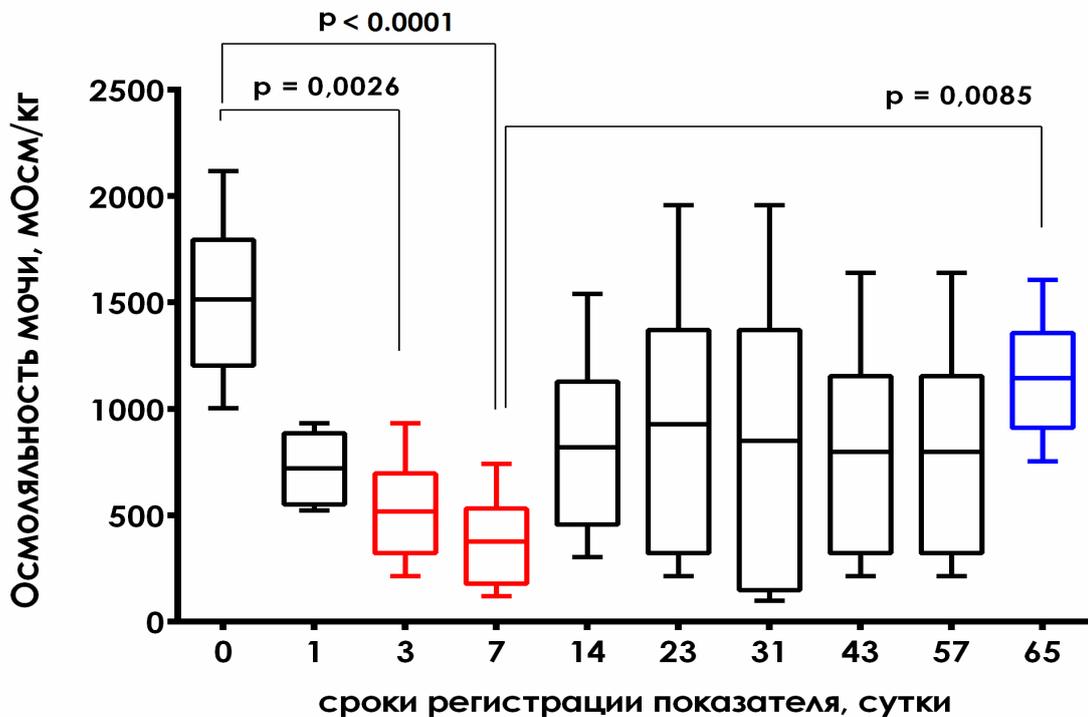
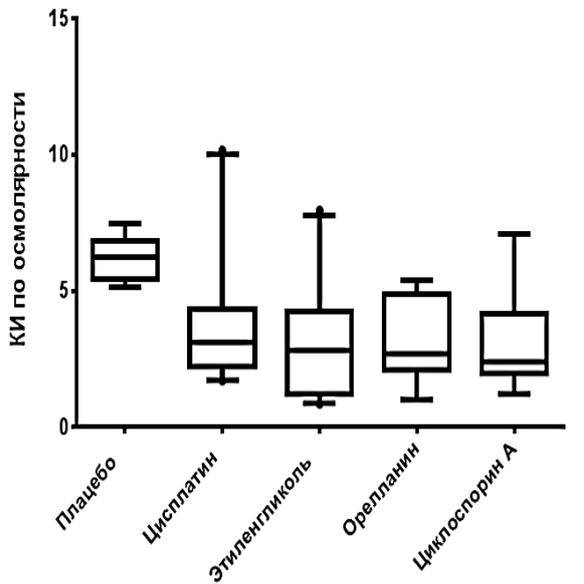
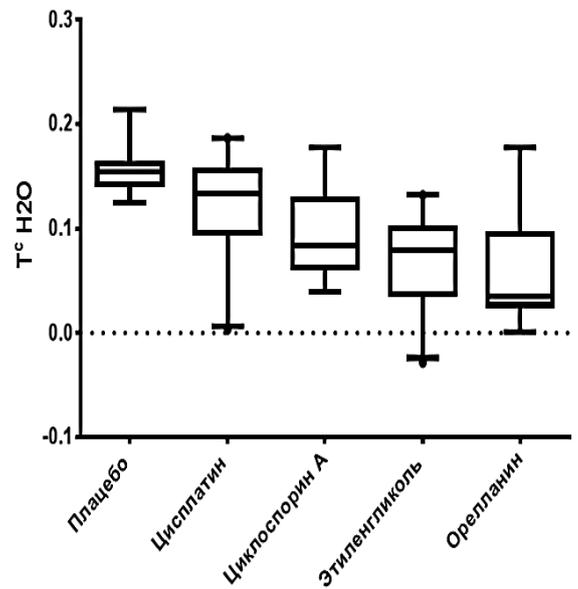


Рисунок 28 – Динамика осмоляльности мочи крыс самцов при однократном отравлении этиленгликолем в дозе 6 мл/кг.

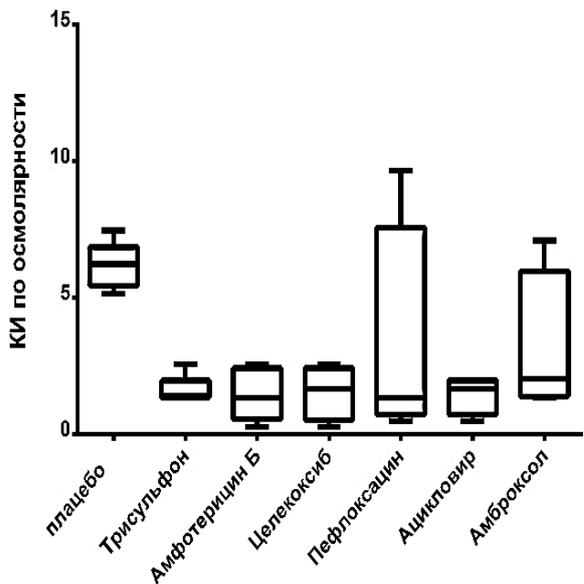
Анализ полученных данных показал, что при действии нефротоксинов на почки происходит усиленное расходование энергии и формируется тканевой дефицит макроэрга АТФ, который обуславливает утрату функций почек и гибель клеток, главным образом канальцевого аппарата. Нами установлено, что в раннем периоде отравления первичные нарушения происходят в отношении концентрационной функции и сопровождаются гипо- и изостенурией, относительной полиурией, потерей натрия, ингибированием процессов реабсорбции воды, присоединяются нарушения энергозатратных транспортных систем канальцев, что соответствует описанным в научной литературе данным [127, 166]. Активация обратной тубулогломерулярной связи приводит в дальнейшем к снижению скорости клубочковой фильтрации (СКФ) для сохранения теряемого с мочой натрия [184], а не вследствие поражения клубочков [115, 173].



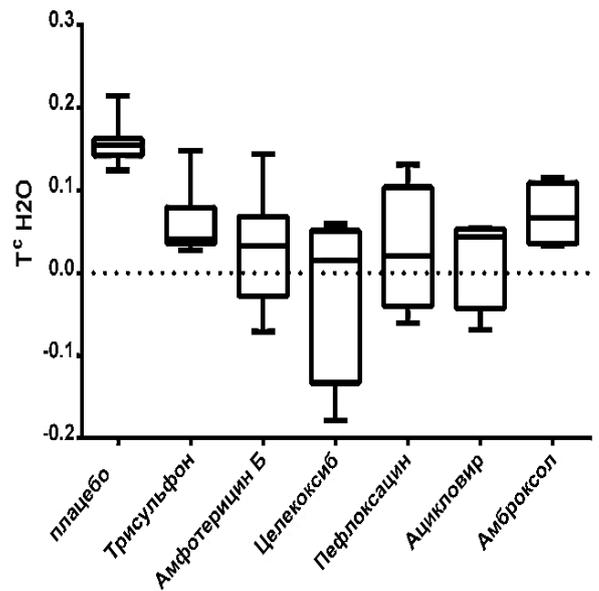
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Цисплатин vs. Плацебо	-24.22	No	ns	0.0774
Циклоспорин А vs. Плацебо	-33.29	Yes	**	0.0042
Этилениколь vs. Плацебо	-33.99	Yes	**	0.0015
Орелланин vs. Плацебо	-30.63	Yes	*	0.0264



Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Циклоспорин А vs. Плацебо	-27.46	Yes	*	0.0365
Этилениколь vs. Плацебо	-36.97	Yes	***	0.0004
Орелланин vs. Плацебо	-43.52	Yes	***	0.0002
Циклоспорин А vs. Цисплатин	-13.28	No	ns	0.8077
Этилениколь vs. Цисплатин	-22.79	Yes	*	0.0114
Орелланин vs. Цисплатин	-29.33	Yes	**	0.0057



Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Трисульффон vs. плацебо	-20.72	Yes	*	0,0179
Амфотерицин Б vs. плацебо	-23.42	Yes	**	0,0018



Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Амфотерицин Б vs. плацебо	-24.14	Yes	**	0,0014
Целекоксиб vs. плацебо	-29.72	Yes	**	0,0066
Пефлоксацин vs. плацебо	-28.72	Yes	*	0,025

Рисунок 29 – Различия во влиянии нефротоксинов и ряда лекарственных препаратов на концентрационный индекс (КИ) по осмолярности и величину максимальной реабсорбции воды (Tc H₂O) у крыс. Множественные сравнения по тесту Данна.

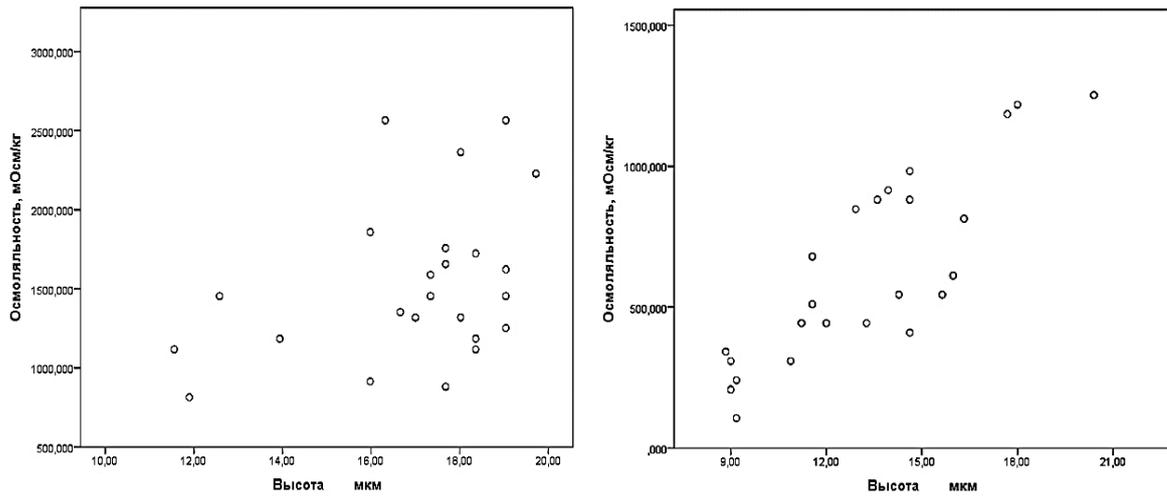


Рисунок 30 – Связь высоты нефротелия канальцев с осмоляльностью мочи крыс: в норме (слева) отсутствует и при токсической нефропатии, вызванной отравлением УАД (справа): $r=0,843$ (95% ДИ 0,666-0,930), $p<0,0001$.

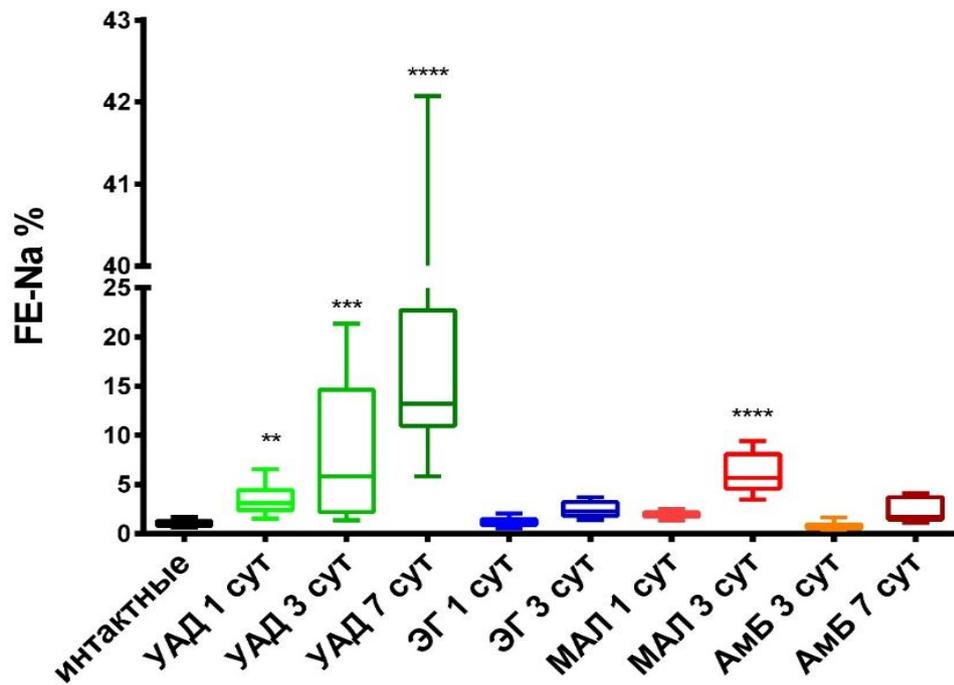


Рисунок 31 – Влияние различных нефротоксинов на величину фракционной экскреции натрия (FE-Na, %) с мочой у крыс. Обозначения: АМБ – амфотерицин Б, МАЛ – малеат натрия, УАД – уранил ацетат дигидрат, ЭГ – этиленгликоль. Множественные сравнения по тесту Данна.

При воздействии большого числа нефротоксинов прямого действия мы наблюдали независимое от пола нарушение концентрационной функции почек, что характеризовалось снижением плотности и общего солесодержания мочи, КИ по осмолярности – вследствие нарушения работы транспортных систем тубулоинтерстициального компонента нефронов, а для осмотических ядов (этиленгликоль) – развития онкозиса и полиурии. Острое отравление ЭГ характеризовалось метаболическим ацидозом с высокой анионной разницей, смешанным метаболическим ацидозом-алкалозом в сочетании с другими обменными нарушениями.

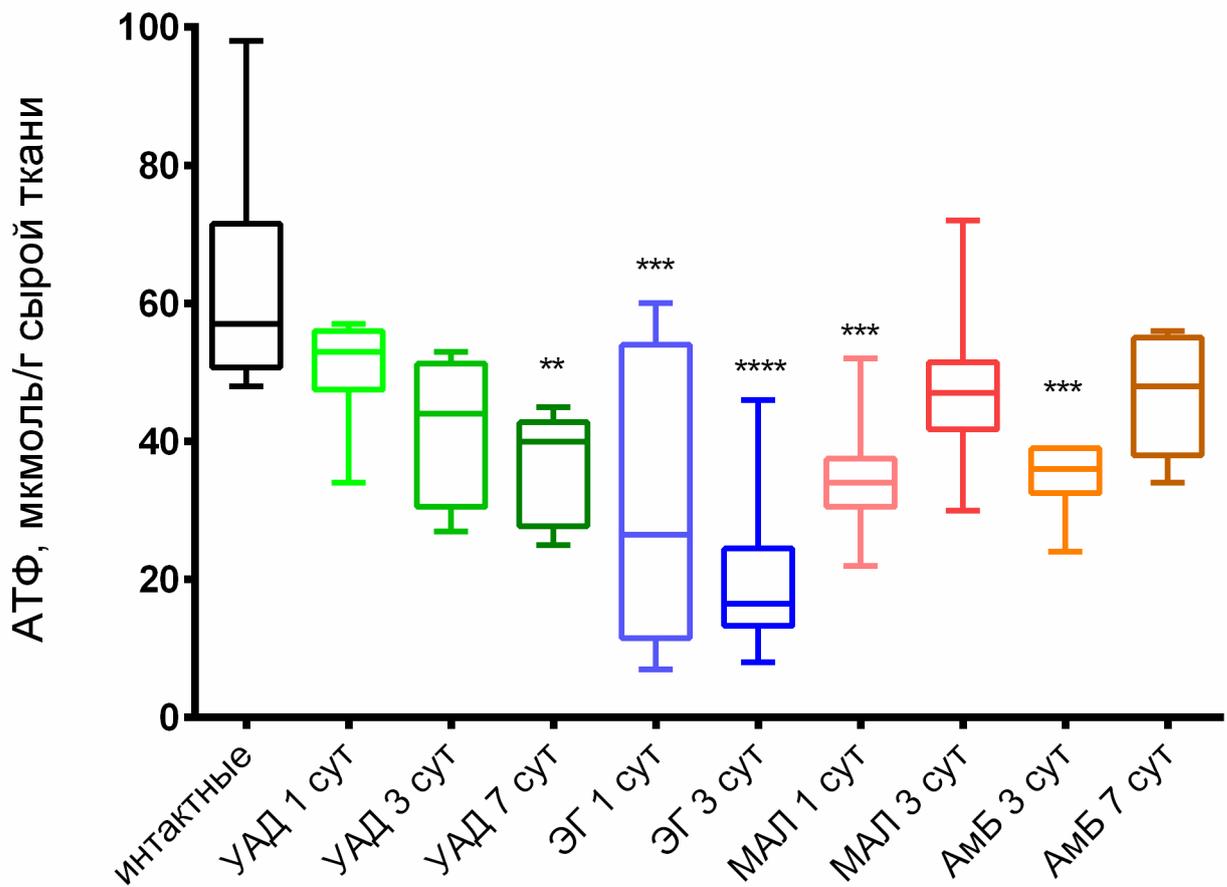


Рисунок 32 – Влияние различных нефротоксинов на уровень АТФ в гомогенате коркового слоя почек крыс. Обозначения: УАД – уранил ацетат дигидрат, ЭГ – этиленгликоль, МАЛ – малеат натрия, АмБ – амфотерицин Б. Множественные сравнения по тесту Данна (звёздочки – отличия от интактных крыс).

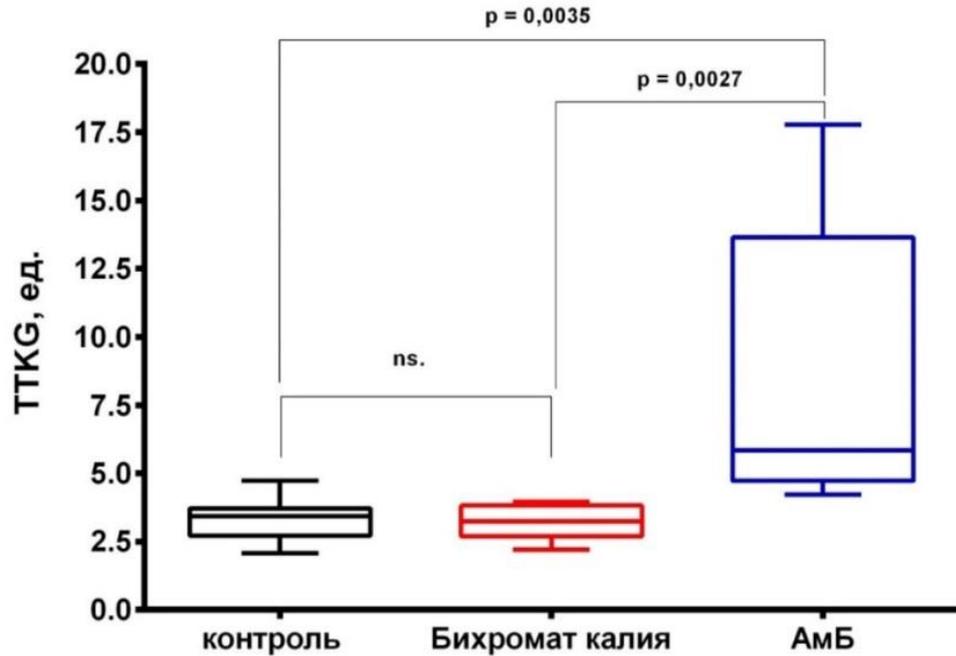


Рисунок 33 – Влияние бихромата калия и амфотерицина Б на величину транс­тубулярного калиевого градиента у крыс. Множественные сравнения по тесту Данна.

Снижение массы тела отмечали у животных при отравлении бихроматом калия и УАД из-за их выраженного токсического и катаболического действия. Результаты исследования функций почек крыс, отравленных бихроматом калия, представлены в таблице 26. Амфотерицин Б отличался от других веществ существенным влиянием на реабсорбцию воды и транс­тубулярный калиевый градиент (Рисунки 29, 33) и энзимурией, происходящей из дистальных канальцев и собирательных трубочек (таблица 12). Сульфаниламидные препараты, секретируемые канальцами почек, при введении в токсических дозах вызывали изолированно нарушение водно-выделительной и концентрирующей функции.

Малеат натрия вызывал нарушение, как процессов фильтрации, так и реабсорбции, по влиянию на экскрецию натрия с мочой соответствующие преренальному фенотипу. Для большинства нефротоксинов характерным было преобладание лейкоцитурии над гематурией, нарушение нескольких функций почек: концентрирующей, акваретической, транспортной, с умеренной протеинурией, энзимурией проксимального типа, лейкоцитурией и цилиндрурией (имеющий схожие черты с описываемым в литературе неполным синдромом Фанкони [222, 272]).

Объем выделяемой мочи при токсической нефропатии, вызванной введением бихромата калия, увеличивался в 2,7 раза по сравнению с группой контроля с возрастанием диуреза в 1,97

раза. Было выявлено снижение плотности мочи и рН на 0,5 единиц. При этом не отмечали развития глюкозурии. Электролитный сдвиг характеризовался тенденцией к увеличению натрийуреза и выраженным снижением выделения хлоридов. Протеинурия сопровождалась как увеличением концентрации белка в моче, так и снижением уровня креатинина, что характеризовало активацию обратной тубулогломерулярной связи с падением скорости клубочковой фильтрации эндогенного креатинина. Соотношение ферментов ПК и ДКиСТ увеличивалось в 7 раз.

Таблица 26 – Функциональные изменения почек при отравлении бихроматом калия (15 мг/кг)

Показатели	Контрольная группа	ОПП бихромат калия	Уровень значимости p
Объем мочи, мл	8,8±5,4	23,7±10,0	0,0047
Диурез, мл/сут/кг	41,0±24,7	81,0±34,1	0,0191
Глюкоза, мг/дл	0±0	0±0	1
Билирубин, мг/дл	0,2±0,4	0±0	1
рН, ед.	6,3±0,3	5,8±0,5	0,0273
Плотность, г/мл	1,070±0,040	1,020±0,010	0,0057
Кетоны, мг/дл	3,0±4,5	0,8±1,9	0,3992
Нитриты, ед.	0±0	0±0	1
Белок, мг/дл	71,4±45,9	186,2±66,5	0,0023
Креатинин, мг/дл	208,4±163,9	58,0±24,1	0,0061
Р/С-Ratio, ед.	0,370±0,220	3,350±0,680	0,0003
ГТФ, Е/л	56,8±89,9	1499,7±748,4	0,0003
ЛДГ, Е/л	46,9±41,6	225,7±78,8	0,0006
ГТФ/Креатинин	0,04±0,07	2,67±1,29	0,0003
ЛДГ/Креатинин	0,03±0,03	0,42±0,17	0,0003
ГТФ/ЛДГ	0,83±0,58	6,98±3,62	0,0003
Натрий мочи, ммоль/л	14,0±16,4	18,8±17,5	0,5150
Калий мочи, ммоль/л	60,2±28,4	63,1±23,8	0,7012
Хлориды мочи, ммоль/л	30,6±10,4	6,8±3,5	0,0003
Na + Cl	44,6±21,2	25,7±20,6	0,0672
Na / K	0,18±0,17	0,30±0,19	0,3169
Cl / Na + K	0,50±0,21	0,09±0,03	0,0003
K / K + Na	0,86±0,12	0,78±0,11	0,3169
AP мочи, ммоль/л	43,6±39,4	75,1±32,6	0,1532
Натрий крови, ммоль/л	137,2±1,8	132,6±2,9	0,0021
Калий крови, ммоль/л	6,98±0,69	5,96±0,38	0,0065
Хлориды крови, ммоль/л	103,2±0,9	98,3±2,3	0,0024
AP крови, ммоль/л	13,0±2,3	12,2±2,2	0,5932

Примечание: рН – водородный показатель; Р/С-Ratio – индекс белок-креатинин; ГТФ – гамма-глутамилтрансфераза; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; AP – анионная разница

3.3 Морфологические изменения почек в диагностике токсических нефропатий

Методы оценки повреждения почек включали в себя следующие гистопатологические приёмы. Последовательность гистопатологического исследования: макроосмотр, взвешивание почек и осмотр в процессе вырезки/кассетирования образцов, фиксация, проводка срезов и заливка в блоки, изготовление срезов, обзорная окраска гематоксилином и эозином, просмотр препаратов, рекомендации по детализации повреждений, выбор дополнительных методов окраски, окрашивание электрокраской или применение других методов (флуоресцентная, поляризационная микроскопия). Для ОПП ренального и смешанного фенотипа были характерны следующие макроскопические признаки поражения почек: мраморный рисунок, увеличение линейных размеров почек, бледность окраски коркового слоя, шоковая перестройка внутривисцеральной гемодинамики в виде гиперемии мозгового слоя (Рисунок 34).

Полуколичественную градацию повреждений выражали в баллах, соответствующих площади и глубине поражения тубулоинтерстициального и гломерулярно-сосудистого компонентов, главным образом, интракортикальных нефронов, которые наиболее специфично повреждаются при действии нефротоксинов. Для локализации и выявления патологических изменений была использована PAS окраска по Шиффу без или с докраской ядер гематоксилином (Рисунки 35, 36), которая позволяет выявлять щёточную кайму нефротелиоцитов проксимальных канальцев (75% объема коркового слоя почек крыс), отсутствующую у нефротелия других участков нефронов, разграничивать области коркового и мозгового слоёв.

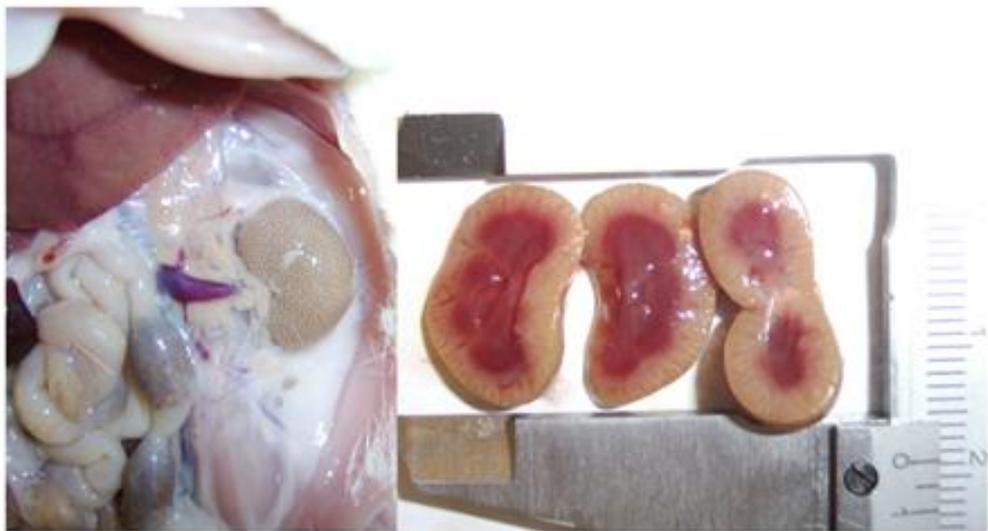


Рисунок 34 – Макроскопическая картина острого повреждения почек при отравлении УАД.

Увеличение 2.

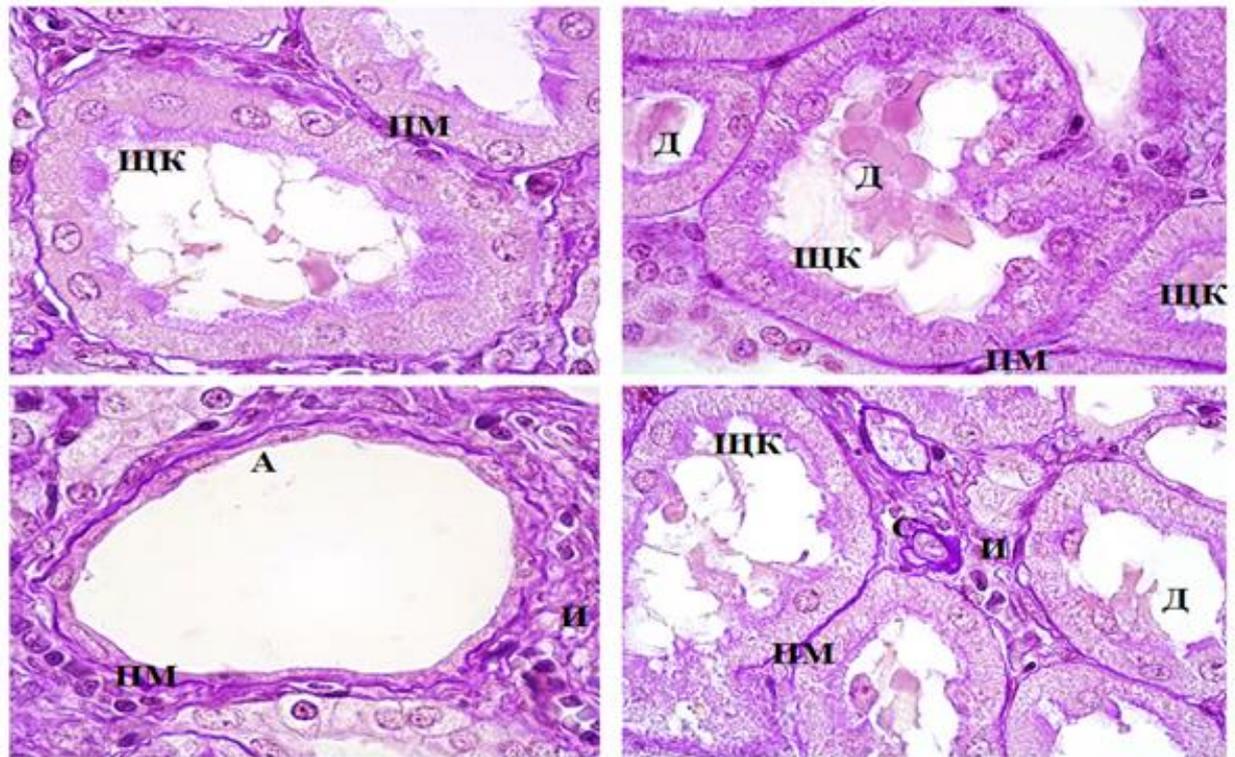


Рисунок 35 – Выявление щёточной каймы нефротелия проксимальных канальцев с помощью PAS окраски. Увеличение 1000. Обозначения: А – атрофия нефротелиоцитов; Д – клеточный дебрис в просвете канальцев; И – интерстиций; С – сосуды; ПМ – перитубулярная базальная мембрана; ЩК – щёточная кайма апикальной мембраны нефротелиоцитов.

Детальное сравнение действия различных ядов показало, что наряду с уменьшением числа клеток с щёточной каймой в индивидуальных канальцах, выявлялись и такие признаки, как утолщение базальной мембраны канальцев, вспенивание мембраны («блеббинг»), наличие внутрипросветных цилиндров и клеточного дебриса. Гипоксически и токсически изменённые клетки проявляли выраженную фуксинофилию цитоплазмы. Отчётливо выявлялась патология внутривисочечных сосудов. У животных из контрольных групп патологические изменения были минимальными или отсутствовали, строение почек не было нарушено. В почках погибших крыс, отравленных этиленгликолем, при светооптической прямой микроскопии в обычном режиме были выявлены острые гемодинамические расстройства в виде резкого полнокровия сосудистого русла с развитием стаза эритроцитов как в корковом, так и в мозговом слоях, гидропическая дистрофия с поражением около 1/3 канальцев коркового слоя почек, некротические изменения эпителия в 2/3 канальцев, детритические гомогенные эозинофильные бесструктурные массы в просветах повреждённых канальцев; в интерстиции коркового слоя и переходной зоне отек, диффузная лимфоплазмоцитарная инфильтрация. Патологические изменения в почках

свидетельствовали о развитии острого канальцевого некроза и появлении метаболита оксалата кальция.

Применение метода поляризационной микроскопии выявило яркие светящиеся двулучепреломляющие кристаллы в форме вытянутых гирь и октаэдров, соответствующие оксалату кальция, преимущественно локализованные в просвете канальцев (Рисунок 37, слева). Наличие двояколучепреломляющего материала выявляли как в ткани почек, так и в препаратах из осадков мочи животных, отравленных сульфаниламидными препаратами (Рисунок 37, справа). Следует отметить, что поляризационно-микроскопический метод с высокой степенью специфичности выявляет материал, обладающий двояколучепреломляющими свет свойствами, что определяет важное значение данного метода в изучении токсических нефропатий. Двояколучепреломляющим материалом являются как эндогенные метаболиты (соли кальция), так и кристаллы ксенобиотиков и нефротоксинов. Эффект контрастирования при просмотре микропрепаратов позволяет лучше визуализировать невидимые при обычной световой микроскопии объекты интереса. Кристаллы могут находиться в просвете канальцев и интерстиции почечной паренхимы, в составе гранулём, а также в составе тромбов внутривисочечных сосудов. Помимо интересующих кристаллов и их включений свечение в поляризованном свете микроскопа дают коллагеновые волокна сосудов почек, а также артефактные нити и волокна тканей синтетического происхождения. Двояколучепреломляющими также могут выступать капли жира при развитии нефротического синдрома и жировые (восковидные) цилиндры.

Гиалиновые капли выявляли при окраске парафиновых срезов полихромным методом Фрейзера-Лендрума (модифицированный метод 5 пикро-Маллори), а жировые вакуоли при гистохимической окраске криосрезов масляным красным О (отравления гентамицином, малеатом натрия, соединениями ртути, хлорорганическими растворителями, циклофосфамидом, уксусной кислотой). В ряде случаев на фоне острого некроза канальцев воспалительный инфильтрат интерстиция был выраженным (бихромат калия (Рисунок 38 Б), уран), минимальным (аманитин) или отсутствовал (орелланин), что свидетельствовало о чрезвычайной силе яда, ингибировании миграции лейкоцитов (циклофосфамид) (Рисунок 38 Г). Метод окраски Фрейзера-Лендрума показал превосходную визуализацию всех структурных элементов почки: стромы, интерстиция, сосудов, клубочков и канальцев. Гидропическую дистрофию нефротелия ПК вызывали осмотический яд этиленгликоль и аманитин из Галерины осенней (Рисунок 38 А). При гистохимической окраске на жир масляным красным О выявлялись крупные ($p=0,0065$) и мелкие ($p=0,0022$) капли жировых включений в цитоплазме значительной части нефротелиоцитов (Рисунок 38 В). Преимущество данного красителя заключалось в возможности провести количественное определение на микрофотографиях при морфометрическом анализе.

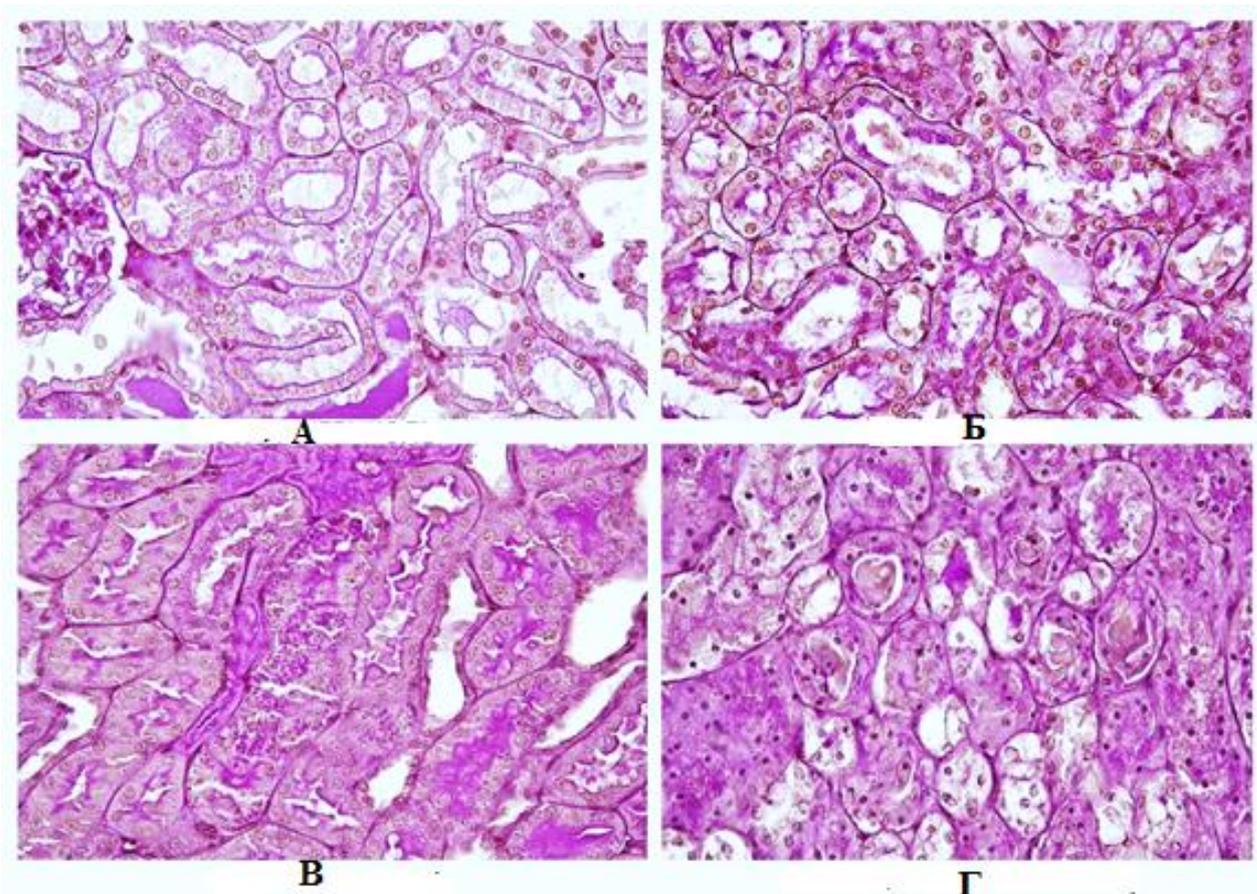


Рисунок 36 – Варианты патологических изменений канальцев коркового слоя почек при токсической нефропатии и применения PAS окраски (А – отравление этиленгликолем, Б – цисплатином, В – малеатом натрия и Г – экстрактом Паутинника). Увеличение 200.

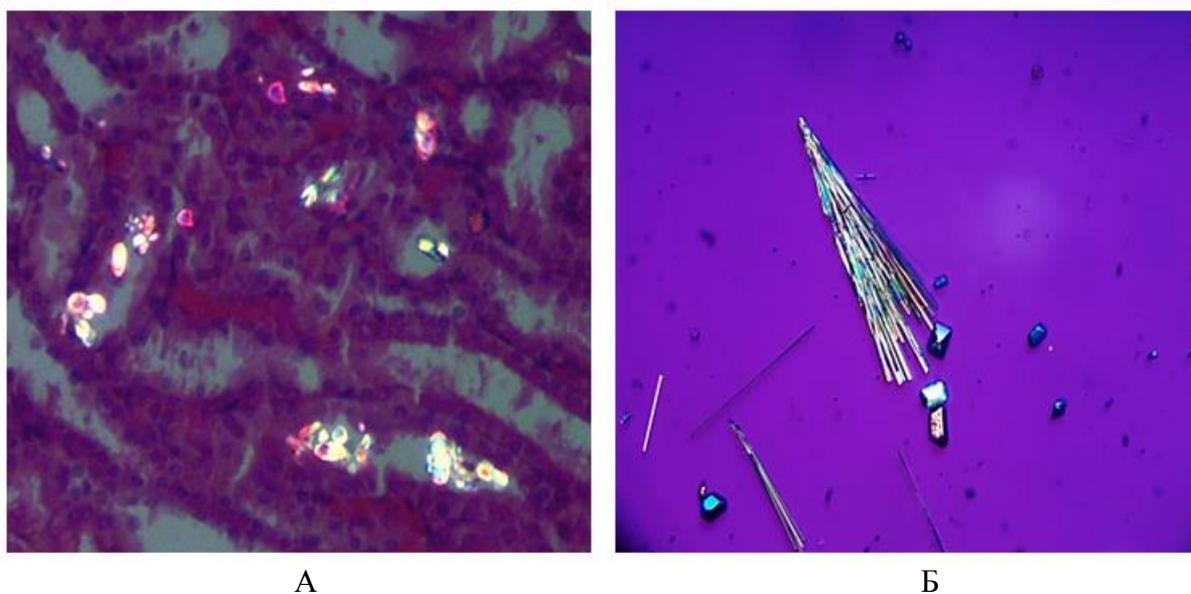


Рисунок 37 – Выявление кристаллов оксалата кальция в проксимальных канальцах при отравлении этиленгликолем (А) и пучка кристаллов N-ацетил-сульфамометоксина в осадке мочи (Б) методом поляризационной микроскопии. Увеличение 200.

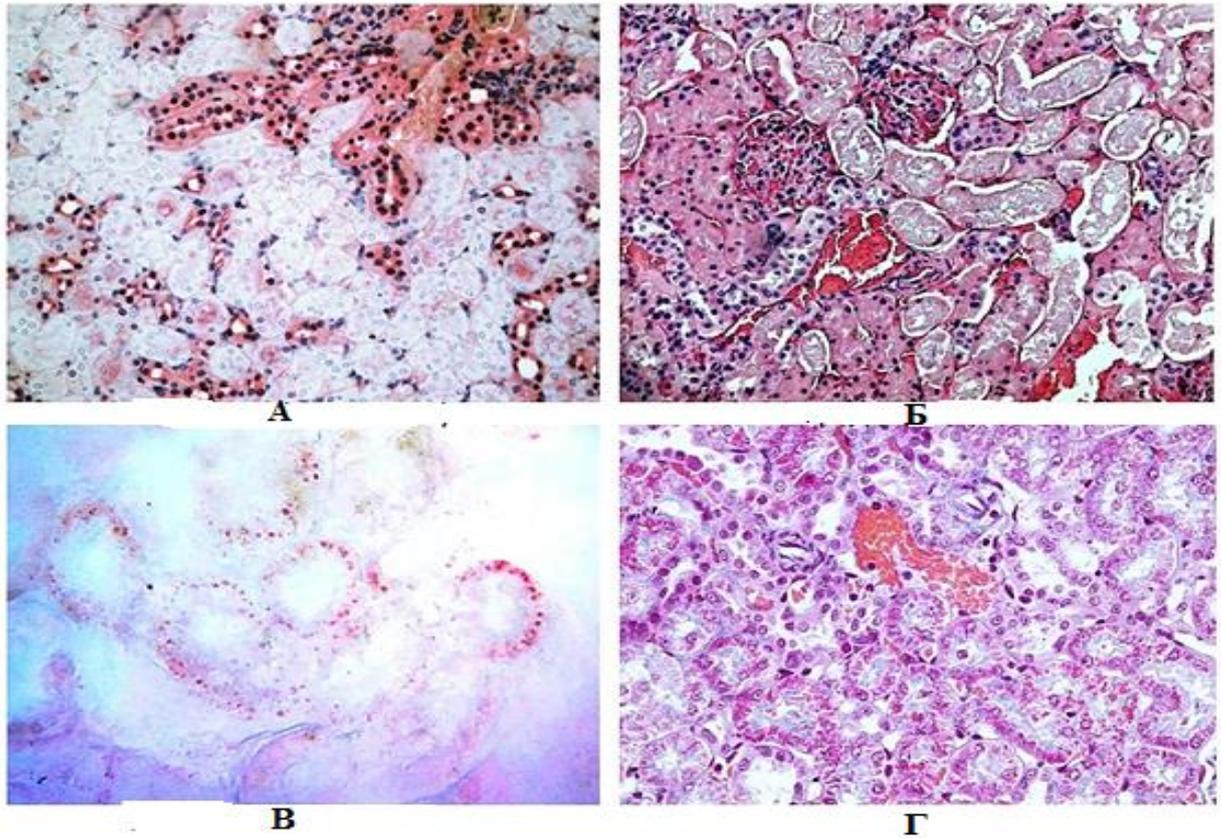


Рисунок 38 – Выявление гидropической дистрофии (А – отравление аманитином) и некроза нефротелия проксимальных канальцев (Б – отравление 1,2-дихлорэтаном) при окраске гематоксилином и эозином. Жировые вакуоли нефротелия (В – отравление мертиолятом), окраска масляным красным О. Гиалиновокапельная дистрофия нефротелия канальцев (Г – отравление циклофосфамидом), окраска по Фрейзеру-Лендруму. Увеличение 200.

При отравлении деструктивным ядом бихроматом калия (15 мг/кг однократно п/к) у крыс на 3 сутки развивался симметричный ОКН всех сегментов проксимальных канальцев (Рисунок 39). Он захватывал от 1/3 до 2/3 площади коркового слоя. Выявлено до 70% некротизированных ПК, 15-20% регенерирующих канальцев и 10-15% канальцев в состоянии белковой и вакуольной дистрофии, воспалительный инфильтрат в интерстиции. Гибель животных наступала в течение первой недели после отравления от терминальной уремии и ренопривного состояния. Патоморфологические изменения в почках соотносились с составом осадка мочи (наличием клеток канальцев, лейкоцитов и цилиндров). При отравлении грибными токсинами ОКН был широко распространён в коре (Галерина, Паутинник), а также сопровождался кровоизлияниями с пропитыванием фибрином, ишемией и сдавливанием нижележащих структур мозгового слоя (Паутинник).

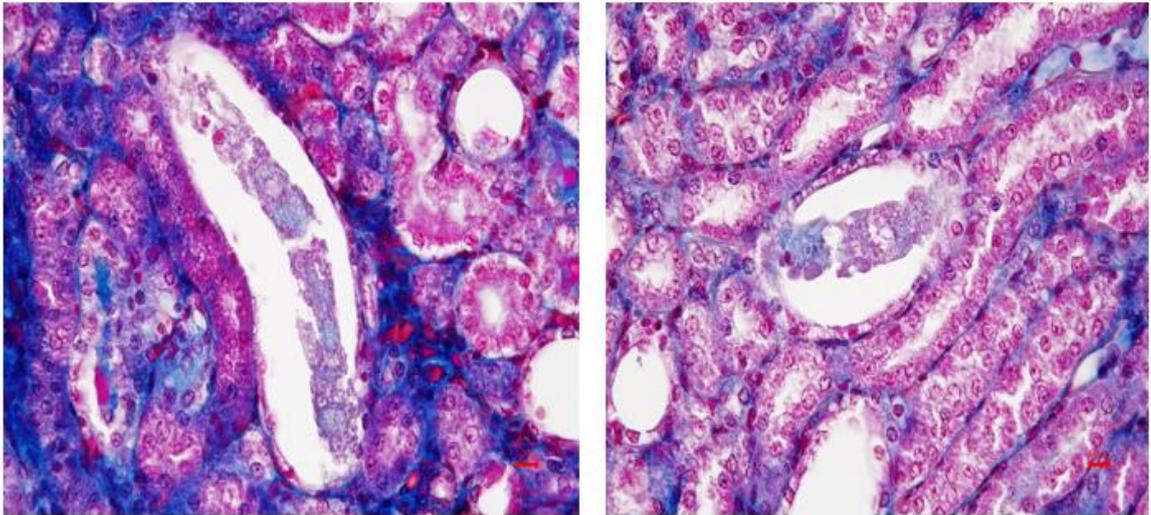


Рисунок 39 – Внутриспросветное расположение клеточного дебриса – цилиндров и некроз нефротелия проксимальных канальцев при токсической нефропатии (бихромат калия).

Окраска по МакФарлану. Увеличение 400.

Схожие изменения в почках, но с выраженной жировой дистрофией канальцев коркового слоя выявляли при отравлении сулемой (2 мг/кг однократно в/б), мертиолятом (35 мг/кг однократно в/м), а также 1,2-дихлорэтаном и тетрахлорметаном (0,5 и 2,5 мл/кг однократно в/ж) – дистрофические и некробиотические изменения нефротелия проксимальных канальцев, захватывающие до 60% площади коркового слоя.

При отравлении ацклофенаком натрия отмечали развитие деструктивных и атрофических изменений (Рисунок 40: как в корковом (А, Б), так и мозговом (В) слое почек крыс, а также некроз сосочка (Г), свойственных аналгетической тубулоинтерстициальной нефропатии. Фосфорорганический инсектицид темефос (абат) при остром отравлении крыс самок вызывал выраженный интерстициальный нефрит с лимфогистиоцитарной инфильтрацией мозгового слоя почек. При этом в корковом слое отмечали единичные проксимальные канальцы в состоянии гидропической дистрофии и внутриспросветным появлением дебриса (Рисунок 41). Эти изменения могли быть обусловлены как холиномиметическими эффектами, так и действием метаболита тиодифенола на почки крыс.

При отравлении этиленгликолем и цисплатином отмечали выраженное повреждающее действие на внутриспочечные сосуды в форме отёка, «частокола» эндотелиоцитов, гиалиноза стенки и пролиферации гладкомышечных клеток (ГМК) артериол (Рисунок 42). Схожие изменения были описаны для токсического действия циклоспорина А [234]. Выявленные нами патологические изменения сосудов коркового слоя (Рисунок 43) свидетельствовали о нарушении кровоснабжения обеспечиваемых отделов нефронов, их гипоксии и ишемии.

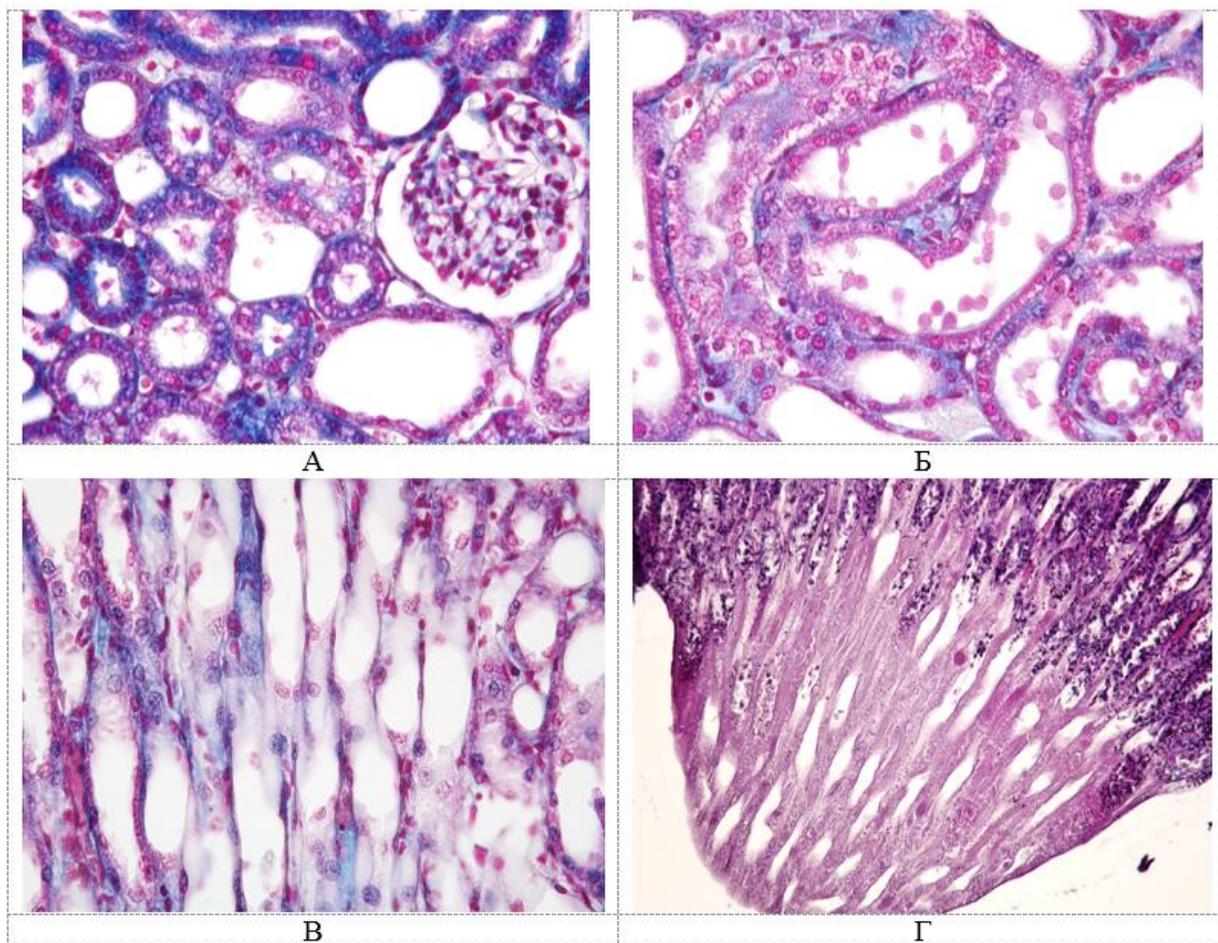


Рисунок 40 – Патологические изменения почки крысы самки после введения ацеклофенака натрия (150 мг/кг). А – вакуолярная дистрофия и некробиоз клеток проксимальных канальцев коркового слоя; Б – слущивание клеток в просвет канальца, сочетание признаков дистрофии, некроза и атрофии нефротелиоцитов проксимальных канальцев коркового слоя почки; В – атрофия нефротелия петель Генле в мозговом слое почки; Г – папиллярный некроз (некроз сосочка почки) и лейкоцитарная реакция как проявление демаркации; окраска по МакФарлану (А-В), увеличение 400 и гематоксилином и эозином (Г), увеличение 100.

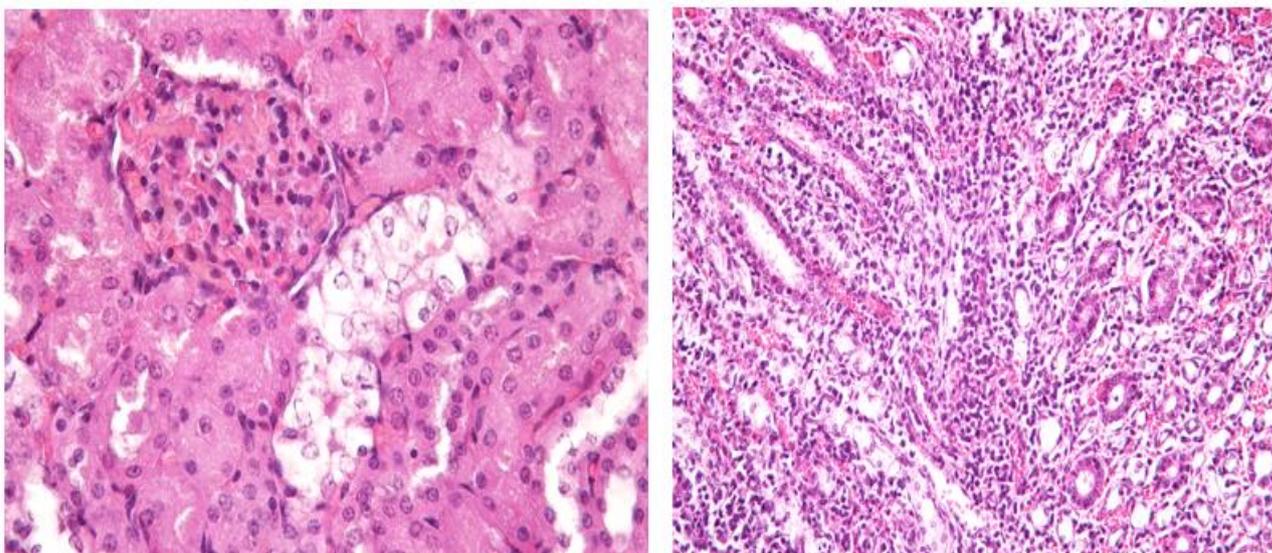


Рисунок 41 – Гидропическая дистрофия нефротелия проксимального канальца коркового слоя почки (слева) и диффузная интерстициальная лимфогистиоцитарная инфильтрация в мозговом слое (справа) при отравлении темефосом крысы самки; окраска гематоксилином и эозином.

Увеличение 400 (слева), 200 (справа).

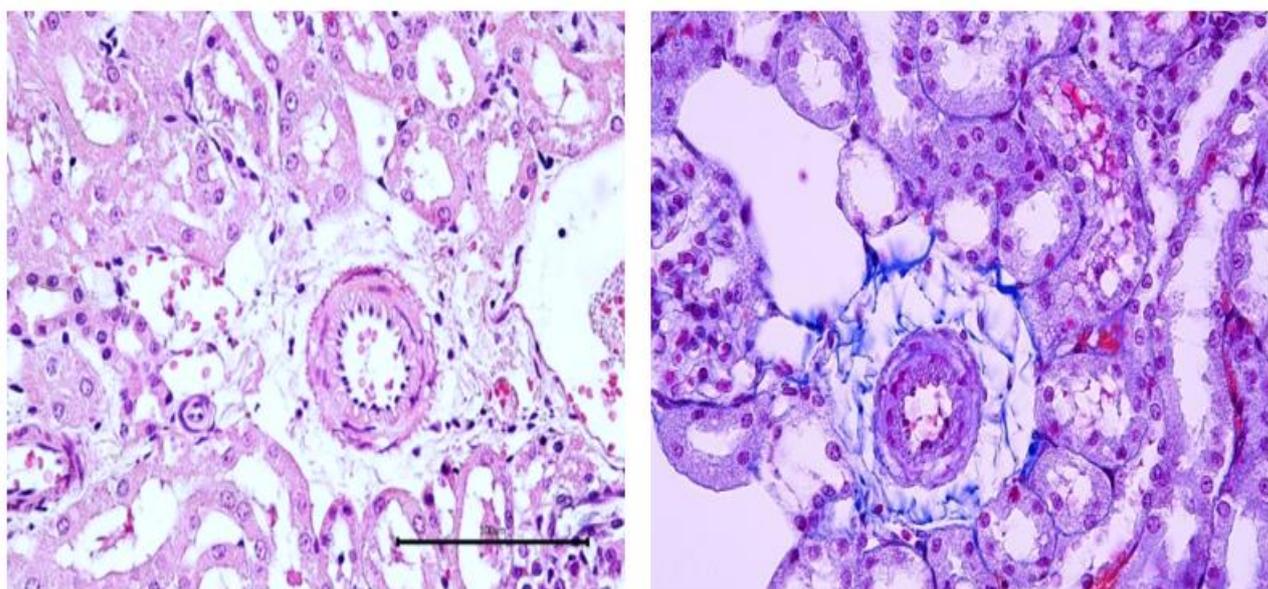


Рисунок 42 – Интерстициальный отек, изменения эндотелия и стенки внутрипочечной артериолы; окраска гематоксилином и эозином (слева, этиленгликоль) и по Фрейзеру-Лендруму (справа, цисплатин). Увеличение 400.

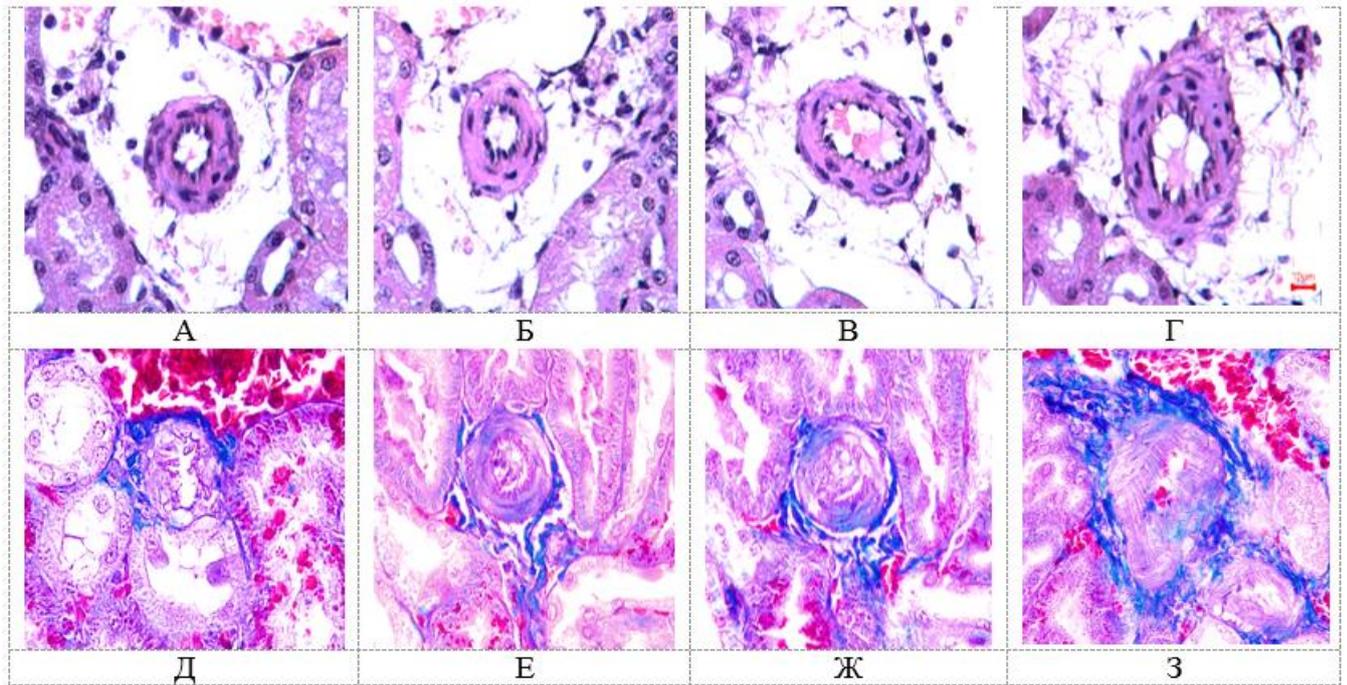


Рисунок 43 – Изменения внутривисочечных сосудов при токсической нефропатии: интерстициальный отёк, пролиферация ГМК и гиалиноз в корковом слое почек крыс (А-Г); окраска гематоксилином и эозином, увеличение 400. Варианты периваскулярного фиброза и стеноза в корковом слое почек крыс с токсической нефропатией (Д-З); окраска по МакФарлану, увеличение 400.

На основании проведённых сравнительных исследований ткани почек крыс при отравлении разными токсикантами были определены следующие гистоморфологические параметры для диагностики токсических нефропатий, представленные в таблице 27. Модификация шкалы EGPI включала в себя дополнительную оценку повреждения стенок сосудов, атрофические изменения нефротелия канальцев и регистрацию интерстициального фиброза. Применение балльной системы оценки позволило объективно перевести качественные признаки токсической нефропатии в количественные.

Острое смертельное повреждение почек ураном проявлялось развитием симметричного кортикального некроза с тотальной гибелью органа на 4 сутки, развитием резчайшей ретенционной гиперазотемии и гиперкалиемии к 6-8 суткам, наступлением ренопривного терминального состояния. Было показано, что существенные морфологические изменения почек развиваются при комбинированном введении соединений урана (10 мг/кг оксида урана и/т + 30 мг/кг в/ж + 30 минутная накожная аппликация; 10 мг/кг оксида урана и/т + 30 мг/кг в/ж + 10 мг/кг оксида урана в/м) и характеризуются накоплением в плазме крови и на поверхности эритроцитов олигопептидов, почечной недостаточностью с ретенцией мочевины и креатинина.

Таблица 27 – Шкала морфологической оценки повреждения почек нефротоксинами

Компонент		Вариант повреждения		Баллы	
Сосудисто-гломерулярный	Эндотелий и сосуды (E)	нет повреждений	нет повреждений	0	
		набухание эндотелия	отек стенки	1	
		разрыв эндотелия	гиалиноз стенки	2	
		утрата эндотелия	стеноз сосудов	3	
Клубочки (G)		нет повреждений		0	
		утолщение капсулы Шумлянско-Боумена		1	
		коллабирование клубочков		2	
		гломерулофиброз/перигломерулофиброз		3	
Тубуло-интерстициальный	Канальцы (T)	нет повреждений	нет повреждений	0	
		утрата щёточной каймы до 25% клеток	дистрофические изменения	1	
		утрата щёточной каймы больше 25% клеток, утолщение базальной мембраны	конденсация хроматина, кариопикноз, апоптотические тельца	2	
		+ гиалиновые цилиндры, некроз до 60%, + некроз более 60% клеток	некроз, клеточный дебрис в просвете	3	
	Интерстиций (I)		нет повреждений	атрофические изменения	4
			инфильтрат, отек, кровоизлияния менее 25% + фиброз, до 25% площади		0
		+ фиброз, до 60% площади		1	
		+ фиброз, больше 60% площади		2	
				3	
				4	
НОРМА:	все компоненты	нет повреждений минимальные изменения		0-2	

При гистологическом исследовании были выявлены расширение просветов капилляров с небольшим эритродиapedезом в коре (диффузно) и мозговом слое с перивазальным отёком внутривисочечных сосудов. Данные представлены на рисунке 44.

В корковом слое отмечали: сочетание дистрофии эпителия с потерей щёточной каймы проксимальных канальцев на различных сегментах; канальцев с признаками некроза эпителия группами, с гомогенной цитоплазмой и пикнотичными ядрами или их отсутствием, местами с денудацией; расширенные атрофические канальцы с утолщением базальных мембран канальцев; регенерирующие канальцы с базофилией эпителия и крупными ядрами – на различных этапах прогрессии (1 сут $T = 0,87 \pm 0,18$ самцы, $0,50 \pm 0,17$ самки; 3 сут $T = 2,50 \pm 0,29$ самцы, $1,40 \pm 0,30$ самки; 7 сут $T = 2,54 \pm 0,24$ самцы, $2,08 \pm 0,31$ самки; норма – $0,19-0,90$); анизокариоз диффузный в коре с заметными ядрышками и гиперхроматозом. Местами встречалась массовая гибель канальцев, соответствующая описанному процессу ферроптозу [377]. В просвете проксимальных канальцев множество гиалиновых цилиндров и слущенных клеток нефротелия с ядрами и без. Сумма баллов EGTI составила на 1 сут $1,4 \pm 0,4$ самцы, $1,0 \pm 0,4$ самки, на 3 сут $5,4 \pm 0,9$ самцы, $3,2 \pm 0,8$ самки, на 7 сут $6,1 \pm 0,8$ самцы и $4,8 \pm 1,1$ самки.

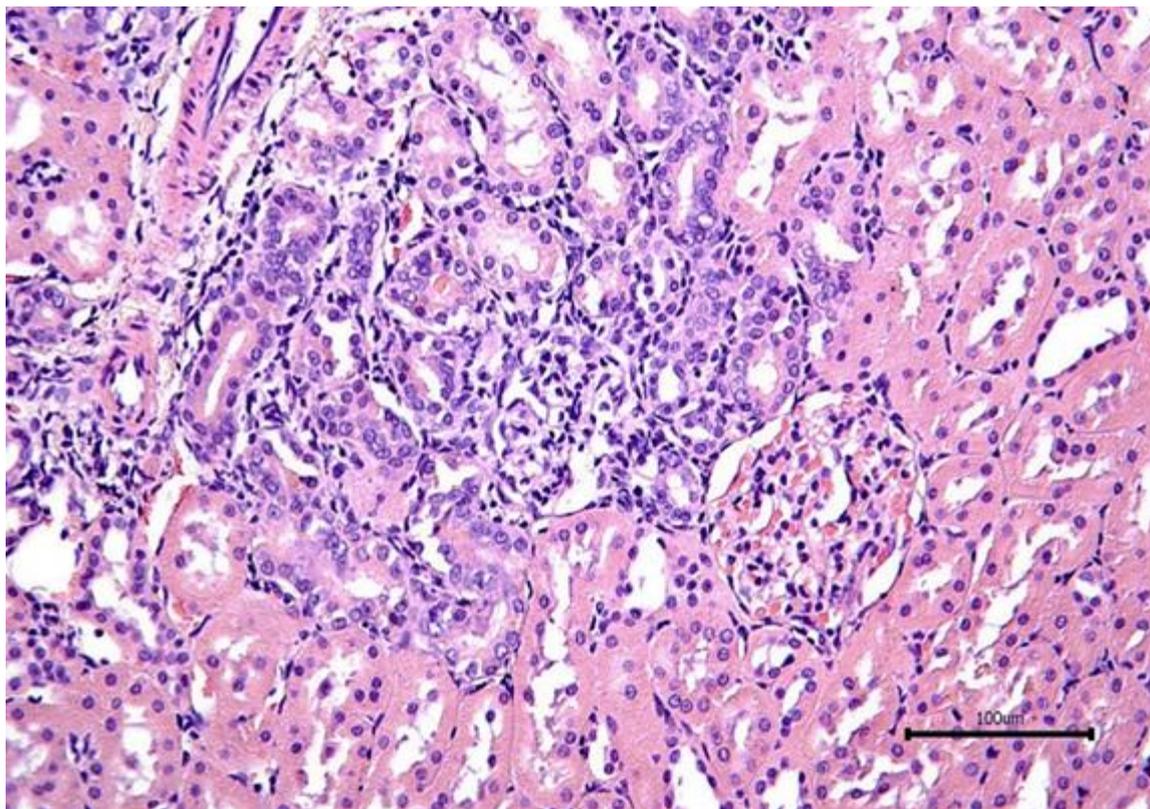


Рисунок 44 – Комбинированное острое отравление соединениями урана (КОТ), токсическая нефропатия на различных этапах прогрессии, интерстициальное воспаление. Увеличение 200.

Острый некроз канальцев проявлялся увеличением цитоплазматической эозинофилии, набуханием цитоплазмы, потерей щёточной каймы и «пузырением» («блеббинг») на апикальной клеточной мембране, фрагментацией ядер и отслоением некротических клеток в просвет канальцев. Изменения напоминали описанные в литературе ферроптоз и некроптоз [119]. Клетки продолжали подвергаться повреждению и гибели в результате сочетания некроза и апоптоза. В мозговом слое – дистрофия эпителия петель Генле с анизокариозом, атрофией нефротелия. В интерстиции коркового слоя – перитубулярные и перивазальные лимфогистиоцитарные инфильтраты (Рисунки 45, 46 Б), в мозговом слое – слабо выраженные. Интерстициальный фиброз не определялся до 7 суток (1 сут $I = 0,31 \pm 0,11$ самцы, $0,20 \pm 0,13$ самки; 3 сут $I = 1,62 \pm 0,30$ самцы, $0,90 \pm 0,28$ самки; 7 сут $I = 2,08 \pm 0,26$ самцы, $1,75 \pm 0,41$ самки; норма – $0,09-0,90$). Полученные результаты подтверждали развитие нефротоксического ОПП, неравномерного вследствие завершения начальных стадий повреждения и вторичной альтерации почек (Рисунок 44). Комбинация окраски пикро-сириусом красным и поляризационной микроскопии выявляла зрелость волокон коллагена вокруг поражённых канальцев – коллаген 1 типа имел оранжево-красное свечение в поляризованном свете, а тонкие молодые волокна 3 типа – зелёное свечение.

Выраженный нефрофиброз был выявлен на модели хронического 18-недельного отравления крыс соединениями урана (Рисунок 46).

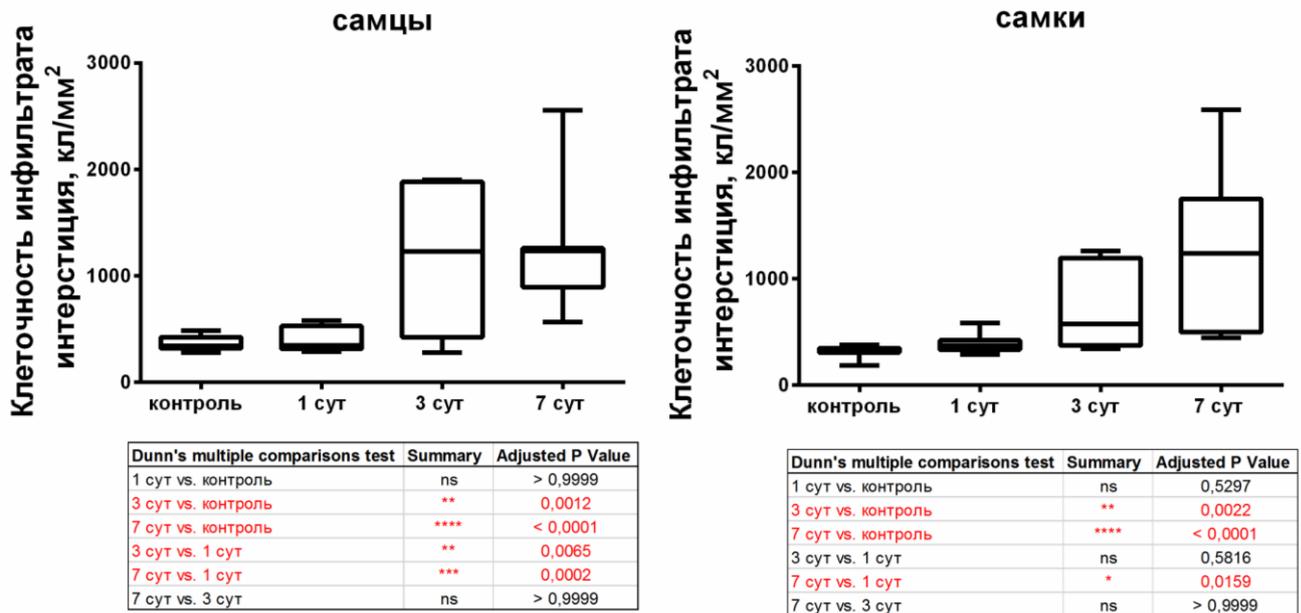


Рисунок 45 – Динамика инфильтрации лимфогистиоцитарными клетками интерстициальной ткани почек крыс на 1-7 сутки токсической нефропатии, вызванной УАД.

Отсроченную во времени гибель ткани почек выявили при отравлении орелланином из яда грибов рода Паутинник. Гистологическое исследование ткани почек крыс было проведено на 1, 2, 5, 7, 10 и 15 сутки после однократного введения экстракта гриба. Наиболее типичное для токсической нефропатии превышение пороговой величины суммы баллов по шкале EGTI больше 2,0 единиц отмечалось только на 10 сутки, а гибель животных развивалась к 14 суткам (Рисунок 47). При этом в течение периода наблюдения в 1-7 сутки за животными в крови не отмечали подъёма уровня мочевины или креатинина, т.е. яд после накопления в ткани почек вызывал отсроченную смерть, чем существенно отличался от всех других нефротоксинов. У погибших крыс в почках выявляли резко выраженное полнокровие всех слоёв с признаками токсического повреждения капилляров. Клубочки были спавшимися, резко полнокровными с расширением капсулы Боумена вследствие спадения капилляров клубочков, скоплением эозинофильных депозитов и лимфоцитов. В корковом слое выявили резко выраженные дистрофические изменения нефротелиоцитов ПК (вакуолизация, кариорексис) и ДК (некроз). В мозговом слое также было обнаружено резкое полнокровие и зернистая дистрофия нефротелия петель Генле и собирательных трубочек.

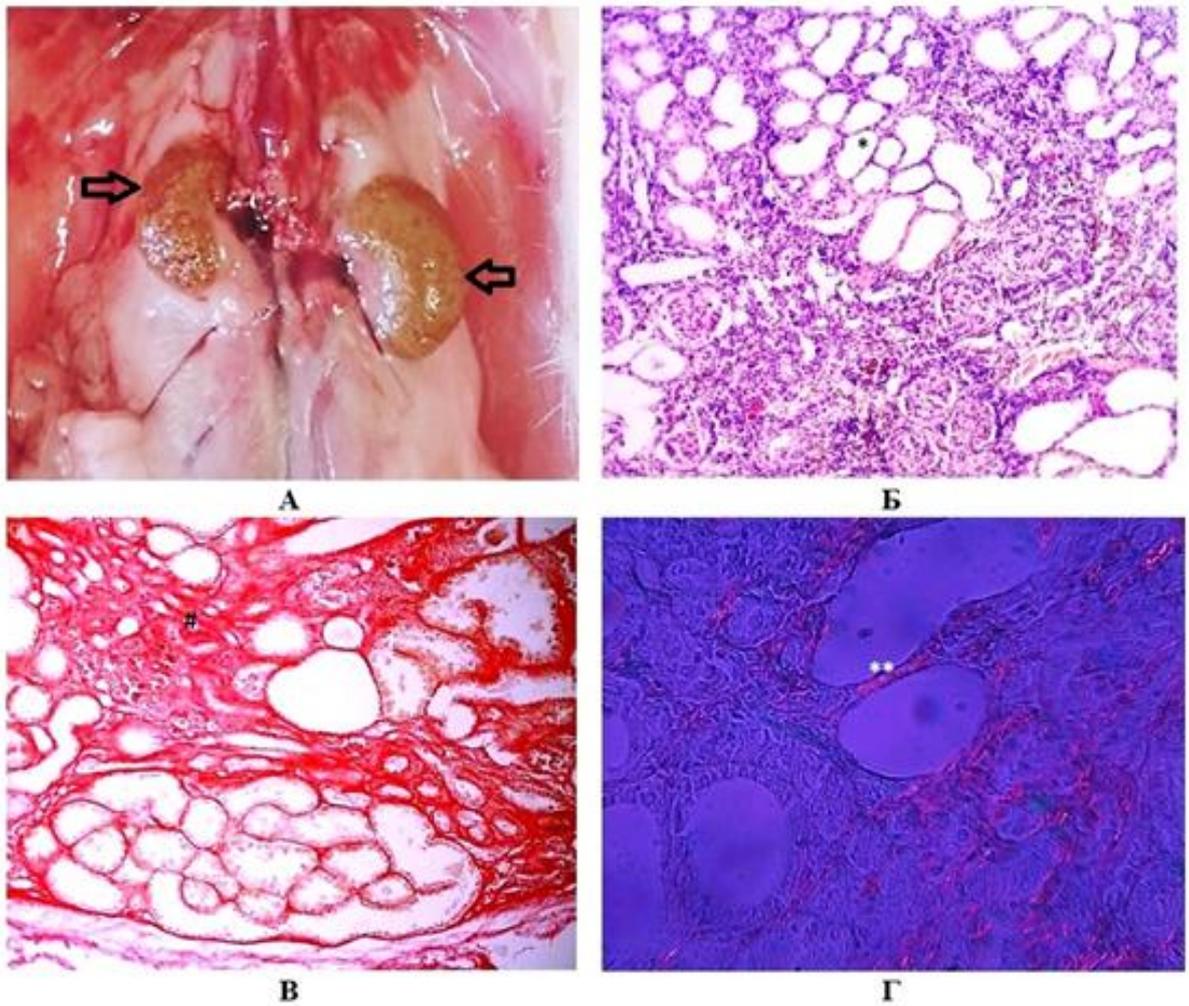


Рисунок 46 – Хронический токсический тубулоинтерстициальный нефрофиброз (введение УАД, 18 недель). А – макрофотография почек (стрелки – бугристая поверхность почек); Б – окраска гематоксилином и эозином; В – окраска пикро-сириусом красным на коллаген; Г – тот же препарат при просмотре в поляризованном свете (** - коллаген 1 типа).

Увеличение: А – 2, Б, В и Г – 100.

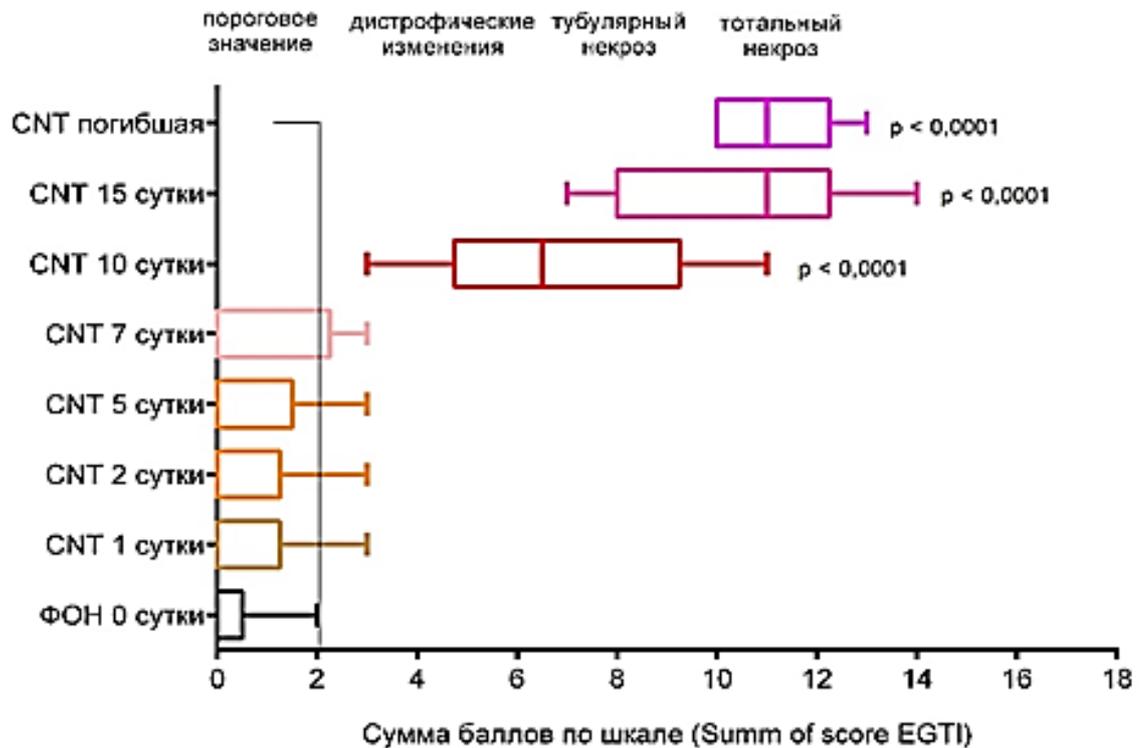


Рисунок 47 – Патоморфоз ОПП при остром отравлении крыс экстрактом Паутинника (CNT), оценённый по шкале EGTI в динамике на 1-15 сутки.

Множественные сравнения по тесту Данна.

Патоморфологическое исследование показало, что нефротоксины вызывают патологию микрососудов почек, дистрофию, апоптоз и некроз, локальную гипоксию, отёк и ишемию нефротелиоцитов, которые препятствуют восстановлению канальцев, а дедифференцированные нефротелиоциты не могут повторно дифференцироваться и становятся атрофическими. Регенерация нефронов при повторяющихся нефротоксических воздействиях вследствие токсикокинетических особенностей нефротоксинов с одной стороны и мозаичная работа нефронов с другой способствуют атипичному её течению – прогрессивному переходу от ОПП к ХБП. Количество клеток проксимальных канальцев с морфологическими признаками разных типов дистрофий, апоптоза и некроза максимально увеличивается в ранний период воздействия нефротоксинов (1-7 сут) в интракортикальных и нефронах переходной S-зоны, а в период с 7 по 21 сутки прогрессирует атрофия нефротелия, моноцитарно-макрофагальная и гистиоцитарная инфильтрация, разрастание соединительной ткани вокруг лимфатических сосудов, артериол и почечных канальцев в интерстиции коркового слоя почек, а также (реже) в мозговом слое почки, приводящие к сжатию паренхимы.

Совокупность выявленных изменений позволила предположить, что при токсических нефропатиях развивается симметричная (двусторонняя) гетерогенная тубулоинтерстициальная патология почек, которая проявляется в форме острого тубулонекроза и его вариантов: тубулонекротического (ренального), гемодинамического (преренального), вакуолярного, миоглобинурического, кристаллического нефрокальцинозного, оксалозного (постренального), а также интерстициального нефрита и поражения внутрпочечных сосудов.

При изучении гистопрепаратов почек отравленных животных было выявлено синхронное течение различных этапов прогрессии и форм патологии тубулоинтерстициальной ткани почек и микроциркуляторного русла. При этом, выявленное нами повреждение почечного микрососудистого отдела может играть важную роль в прогрессировании заболевания почек и развитии почечной гипертензии с высоким риском смерти из-за сердечно-сосудистых событий в отдалённом периоде, что согласовывается с описанными в научной литературе рисками [133, 171, 235, 390, 497, 580, 581]. При изучении признаков апоптоза в первую очередь обращает на себя морфология ядер нефротелиоцитов: наибольшая прозрачность цитоплазмы наблюдалась в петле Генле и нефротелиоцитах мозгового слоя почек, однако максимальное число вариантов ядерных признаков апоптотической гибели было выявлено в нефротелиоцитах проксимальных канальцев – основной мишени нефротоксикантов различного происхождения и химического строения. Для выявления отдельных биомаркеров, экспрессирующихся в ответ на эпигенетический токсический фактор, могут быть использованы приёмы как гистохимической окраски (наиболее доступные полихромные окраски различных вариантов метода Пикро-Маллори, окраска масляным красным на жировые капли в замороженных срезах, окраска гликозаминогликанов альциановым синим и коллагена сириусом красным, по методу Ван Гизона) для большого числа препаратов, обрабатываемых одновременно, так и иммуногистохимической и флуоресцентной реакции.

Разработанный нами алгоритм патоморфологического изучения почек при токсических нефропатиях представлен на рисунках 48 и 49. Последовательное макроскопическое и гистопатологическое изучение почек и окрашенных срезов методом световой и поляризационной микроскопии позволяет идентифицировать общие патологические изменения структур нефронов и выявлять кристаллы токсических веществ и лекарственных препаратов, их метаболитов, а также степень зрелости коллагеновых волокон в случае перехода ОПП в ХТИФ, выявить морфологический вариант ОПП (Рисунок 49).

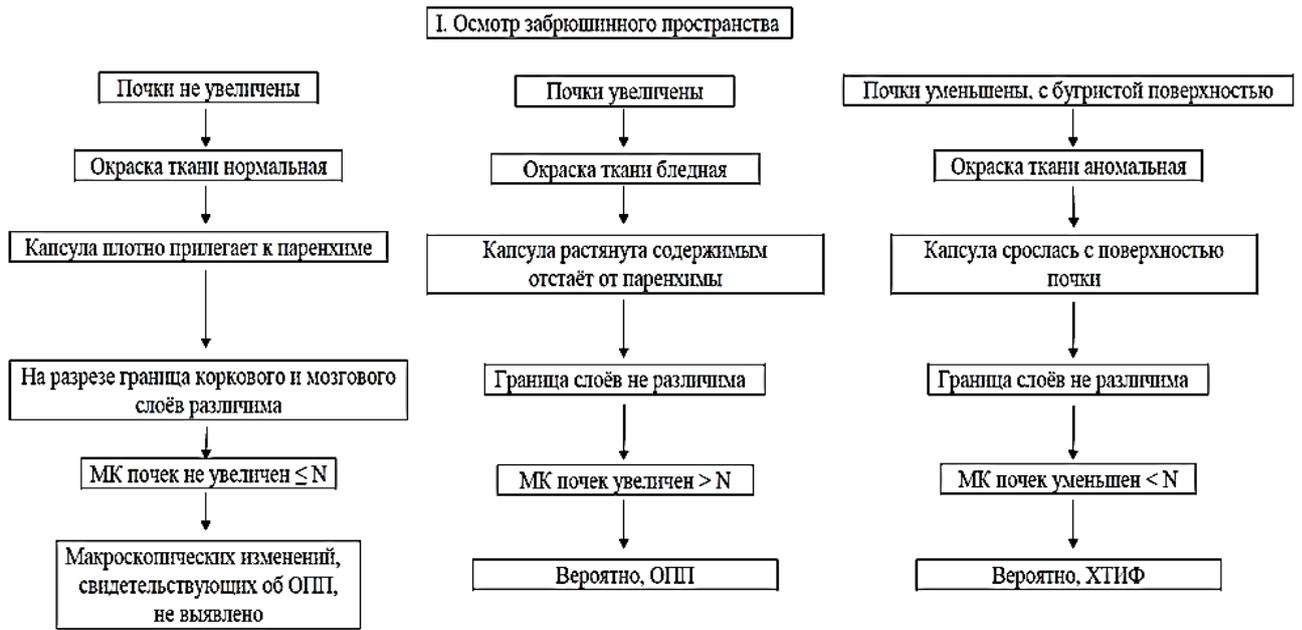


Рисунок 48 – Алгоритм макроскопического исследования почек при токсических нефропатиях.

Обозначения: МК – массовый коэффициент, ОПП – острое почечное повреждение, ХТИФ – хронический тубулоинтерстициальный фиброз, N – нормальные значения.

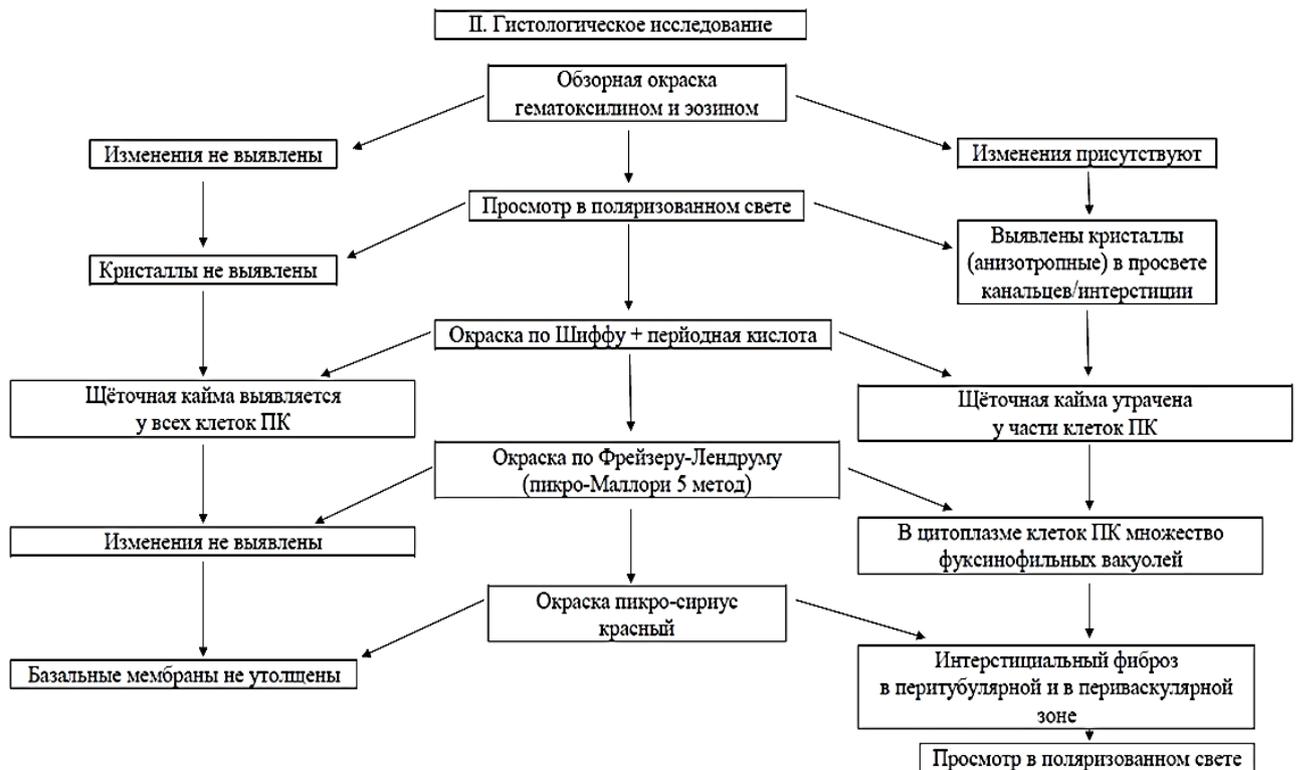


Рисунок 49 – Алгоритм гистологического исследования почек при токсических нефропатиях.

3.4 Заключение к главе 3

Необходимо учитывать физиологическую гетерогенность почек, мозаичное повреждение нефронов, наличие тубулогломерулярной обратной связи и шунтирование кровотока при экзотоксическом шоке, который развивается при большинстве отравлений, так как изменения в почках могут различаться в канальцах, интерстиции и сосудах почек в зависимости от вида нефротоксина и срока регистрации. Схема применения различных подходов к диагностике экспериментальной токсической нефропатии отражена на рисунке 50.

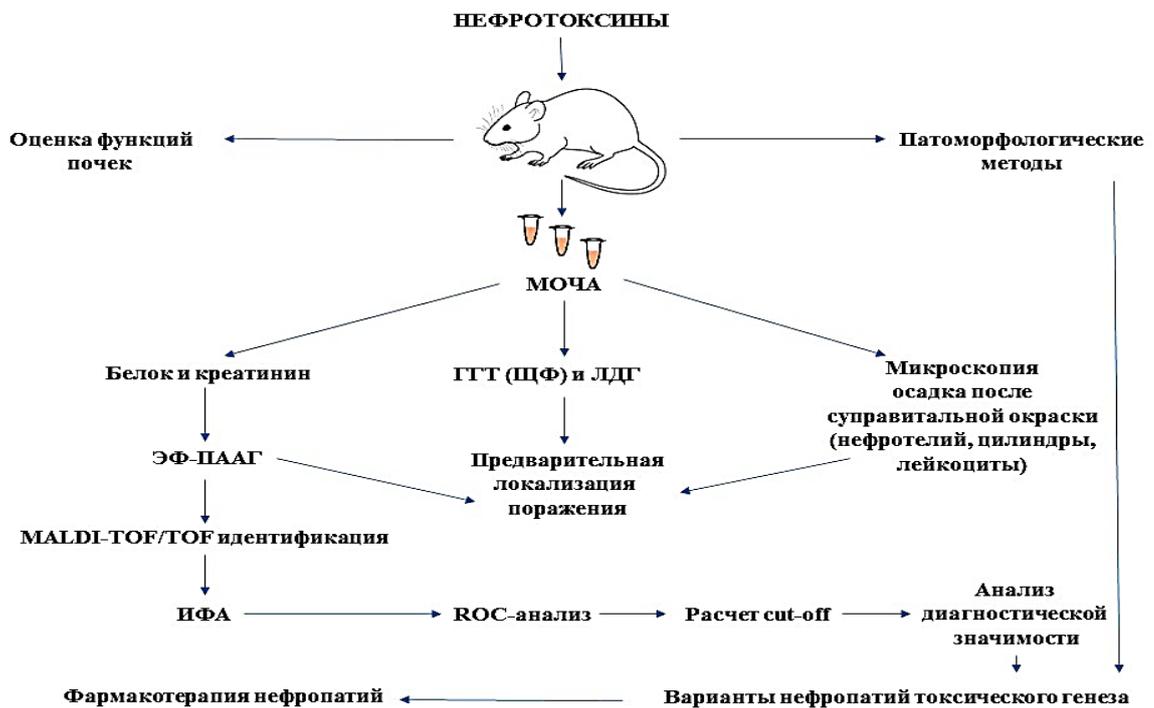


Рисунок 50 – Схема применения различных подходов к диагностике токсических нефропатий.

Анализ полученных результатов показал, что подходы к диагностике токсической нефропатии должны включать в себя:

- определение этиологического фактора с помощью качественных реакций и физико-химических методов (биомаркеров воздействия);
- определение биомаркеров нефротоксичности (эффекта);
- определение функциональных сдвигов гомеостаза;
- проведение патоморфологического исследования почек.

С точки зрения общебиологической реакции клеток почек на воздействие нефротоксинов свидетелями молекулярных событий повреждения являются следующие биомаркеры: фрагменты

цитокератинов, синтезируемые клетками пептиды и белки, ферменты мембран, цитоплазмы и лизосом нефротелиоцитов канальцев, цитокины. Инструментальные автоматизированные методы и промышленно выпускаемые наборы реагентов имеют преимущество для анализа биомаркеров благодаря высокой чувствительности и специфичности, точности и воспроизводимости. Поиск новых маркеров включает: с помощью протеомного анализа белков мочи проводят отбор биомаркеров; определяют морфологический вариант токсической нефропатии в нефробиоптате; для увеличения диагностической мощности теста проводят корреляционный анализ с морфологическими и клинически значимыми функциональными показателями.

Новым подходом является изучение порогового уровня cut-off и кинетики выделения биомаркеров на различные сроки токсической нефропатии, для чего проводят следующие последовательные процедуры:

- проводят кинетическое исследование биомаркеров доступным биохимическим методом или ИФА (в моче или крови);
- графически представляют направленность выявленных изменений для оценки течения и тяжести патологии в динамике (фон – временной интервал – конечная точка);
- проводят ROC-анализ и определяют пороговый уровень биомаркера cut-off при максимальной чувствительности и специфичности;
- при превышении порогового уровня биомаркеров в образцах результат считают положительным (развитие токсической нефропатии – принятие решений);

Интерпретация результатов использования диагностического алгоритма включает соотнесение измеренных показателей относительно установленного порогового значения (таблица 28).

Таблица 28 – Интерпретация результатов оценки токсической нефропатии по биомаркерам

Биомаркер	Превышение порогового значения/фаза ОПП	Клиническое значение
1. cut-off существенно не меняется: биомаркеры повреждения (высокая чувствительность)		
TPA мочи	токсикогенная и переходная фазы	апоптоз и дедифференцировка нефротелиоцитов
NGAL мочи		ОПП, тубулопатия
RBP4 мочи	переходная фаза	проксимальная тубулопатия
MCP-1 мочи		лейкоцитарная инфильтрация
2. cut-off увеличивается со сменой фаз: биомаркеры функции и прогноза (специфичность)		
Креатинин крови	переходная и соматогенная фазы	снижение СКФ
Kim-1 мочи	переходная и соматогенная фазы	ОКН – некроз нефротелиоцитов
TGF-β1 мочи	соматогенная фаза	регенерация и нефрофиброз

Примечание: ОКН – острый канальцевый некроз, СКФ – скорость клубочковой фильтрации, Cut-off – пороговый (дискриминационный) уровень.

ГЛАВА 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ФАРМАКОТЕРАПИИ ТОКСИЧЕСКИХ НЕФРОПАТИЙ

Постановка научной проблемы фармакотерапии токсических нефропатий базировалась на полученных нами результатах изучения патогенеза, где кинетическое исследование выделения биомаркеров с мочой показало, что первичные процессы альтерации – апоптоз и некроз нефротелиоцитов, сменяются инфильтрацией паренхимы лейкоцитами различных субпопуляций и воспалением, разрешающиеся регенерацией части нефронов и переходом ОПП в ХБП с нефрофиброзом. Эксперименты по цитопротекторному и нефропротекторному действию проводили на культуре клеток почечного эпителия, а также *in vivo*. Токсикокинетические исследования установили, что к началу соматогенной фазы концентрация нефротоксинов в биоматериале снижается, что определило перспективным направлением применения антидота урана – гидрокарбоната натрия как лиганда для ионов уранила в составе раствора для перитонеального диализа. Биотрансформация этиленгликоля в гликолевую кислоту и оксалат являлась ключевым процессом формирования нарушений кислотно-основного и электролитного гомеостаза, приводящих к поражению почек и других органов, и это сформировало задачу оценить эффективность неингибирующего холинэстеразу фосфорорганического соединения димефосфона для предотвращения метаболического ацидоза с высокой анионной разницей. Нарушения в микроциркуляторном русле почек и истощение пула макроэргических компонентов, восстановленного глутатиона создало предпосылку для оценки эффективности применения антигипоксантов и метаболических корректоров при токсических нефропатиях как в профилактической, так и лечебной схемах введения. Переход острого повреждения в хроническую болезнь почек из-за дисбаланса профиброгенных воспалительных цитокинов в фазе завершения регенераторных процессов определил необходимость изучения эффективности фитонепропротекторов в схеме терапевтического введения.

4.1 Скрининг перспективных средств терапии токсических нефропатий

Для поиска потенциальных нефропротекторных кандидатов применяли технологию тестирования соединений на культуре почечного эпителия в присутствии типового нефротоксина (дихлорида ртути, уранил ацетата, гентамицина сульфата). В качестве кандидатов были взяты ЛС

с нефропротекторным механизмом действия, основанном на данных об их первичной и вторичной фармакодинамике, а также ряда фармакологических зондов – веществ с антигипоксическими и антиоксидантными свойствами. Контрольными препаратами (референс) служили полгинан с М.м 15-20 кДа и унитиол (димеркаптопропансульфонат натрия) в качестве хелаторов солей ртути. Результаты тестирования ряда фармацевтических субстанций и препаратов *in vitro* показали разнонаправленные эффекты (Рисунок 51, таблица 29).

Нами было впервые установлено, что селективные и неселективные альфа- и бета-адреноблокаторы и дофаминомиметик, триметазидин и гепариноид сулодексид усиливали нефротоксическое действие дихлорида ртути в экспериментах *in vitro* на культуре почечного эпителия, снижая токсическую концентрацию IC_{50} яда. Так как в основе фармакодинамики триметазидина лежит переключение энергетического метаболизма с окисления жирных кислот на окисление глюкозы, а клетки почек, в основном, используют в качестве энергетического субстрата жирные кислоты, триметазидин усиливал токсическое действие ртути. В противоположность этому блокатор кальциевых каналов нитрендипин (Рисунок 51) и низкомолекулярные антиоксиданты тригидрокситрансстильбен (ресвератрол) и тетрагидроксиглюкопиранозилксантен (мангиферин) оказывали выраженное цитопротекторное действие (увеличение IC_{50} в 2 раза). Два диуретика, вмешивающихся в работу транспортных насосов клеток, также снижали цитотоксическое действие ртути на клетки почечного эпителия, вероятно за счет «выкачивания» токсичных ионов (IC_{50} контроль 77 мкмоль/л, торасемид 105,6 мкмоль/л, индапамид 164,6 мкмоль/л). Ослабляли токсическое действие соли ртути также интермедиаты цикла Кребса – сукцинат, малат и фумарат натрия. Таким образом, прямое нефротелиоцитопротекторное действие было установлено только для веществ с антиоксидантным действием (фумарат модифицирует специфические остатки цистеина на KEAP1 и впоследствии активирует Nrf2; нитрендипин, тригидрокситрансстильбен и тетрагидроксиглюкопиранозилксантен) и обладающих способностью влиять на системы реабсорбции натрия (индапамид и торасемид [259, 388]).

УАД показал цитотоксичность и закисление среды при разведении до 1:8 (250 мг/л) - 1:16 (125 мг/л). Гемидисты полностью отсутствовали при разведении УАД 1:8 (250 мг/л) – 1:32 (62,5 мг/л) и появлялись только при разведении 1:64 (31,2 мг/л). Результаты окрашивания на апоптоз показали значительную дегенерацию клеток и ядер, увеличение их размера, наличие клеток с 2-3 ядрышками, окружённых ободком, почти половина клеток была с апоптозом (ярко зелёный цвет) и некрозом (ядра тусклые) (Рисунок 52 А-Б). При добавлении нефропротектора фумарата натрия (разведение 1:8) в равном объёме к соответствующему разведению УАД в концентрации 62,5 мг/мл отмечали появление единичных гемидист. Окрашивание показало значительное

снижение некроза и апоптоза (анизокариоз). Количество клеток, подвергшихся апоптозу, снизилось с почти 20 % до 8,3 % при разведении УАД 1:16 (125 мг/мл).

Гентамицина сульфат показал выраженную цитотоксичность и значительное закисление среды (до разведения 1:32 (1,25 мг/мл)). Монослой был разреженный, с резко очерченными дефектами роста в монослое, клетки были чрезмерно зернистыми и вакуолизированными. Гемичесисты полностью отсутствовали при разведении гентамицина вплоть до 1:64 (0,625 мг/мл). Окрашивание Н-краской показало высокий процент апоптоза (при разведении препарата 1:16 (2,5 мг/мл) – ИА 40-50 %). Клетки были отекающие, с анизокариозом (Рисунок 52 В-Г). Добавление нефропротектора фумарата натрия снизило процент апоптоза до 5-7 %. Ядра клеток были почти все ярко зелёные, в основном, мелких размеров (как в контроле). Встречались единичные ядра очень крупных размеров, тусклые. Разрежение монослоя клеток было значительно менее выраженным.

Нами было установлено, что тестирование цитопротекторов в раститровываемом разведении препаратов на клеточной линии почки собаки (MDCK) в качестве модели *in vitro*, применение выбранных критериев оценки (изменение морфологии клеток, образование гемичесист, наличие апоптоза и некроза) показывают чёткую картину изменения состояния клеток, позволяют вычислить эффективные концентрации, которые значительно снижают цитотоксическое действие нефротоксинов.

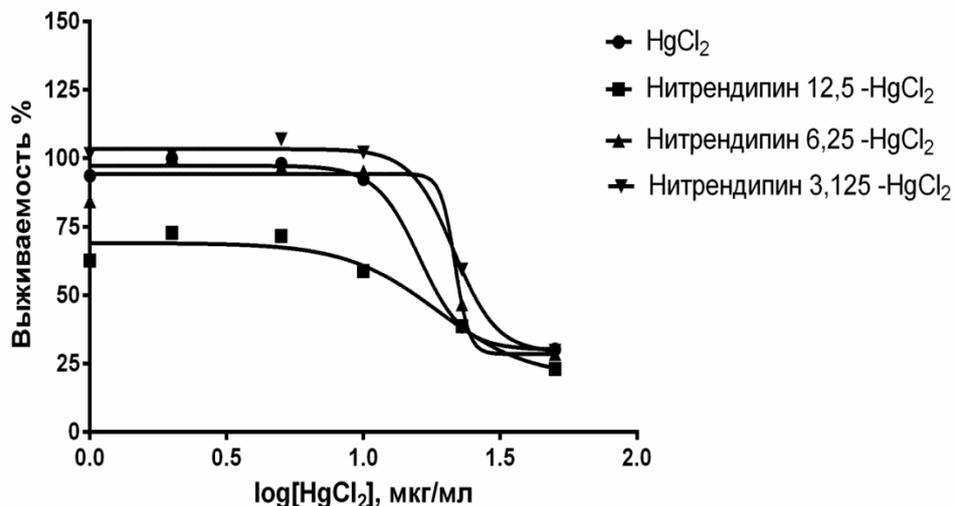


Рисунок 51 – Сравнение кривых выживаемости клеток MDCK при инкубации с типичным нефротоксином сулемой в присутствии цитопротектора нитрендипина в трёх концентрациях.

Рисунок протокола из программы GraphPad Prism.

Таблица 29 – Результаты оценки цитопротекторной активности ряда лекарственных средств *in vitro* на культуре клеток MDCK в тесте NRU

№ пп	Цитопротектор	С, мкг/мл	Токсин Сулема	Разведения препаратов (Р) – среднеингибиторная концентрация			Соотношение IC ₅₀ с Р / IC ₅₀			Действие токсина	ПЦА	
				IC ₅₀ мкмоль/л	Р 1:4 - IC ₅₀	Р 1:8 - IC ₅₀	Р 1:16 - IC ₅₀	Р 1:4	Р 1:8		Р 1:16	мкг/мл
1	Сулодексид	2ЕА/мл	85,2±1,6	22,4±0,8	19,4±1,1	22,9±0,7	0,26	0,23	0,27	усиливает	нд	нд
2	Триметазидин	200	82,0±1,4	18,0±1,1	13,5±0,6	19,5±1,1	0,22	0,16	0,24	усиливает	нд	нд
3	Карведилол	200	97,7±1,8	< 10	< 10	< 10	нд	нд	нд	усиливает	нд	нд
4	Доксазозин	50	77,3±1,7	< 10	37,1±1,2	65,8±1,4	нд	0,48	0,85	усиливает	нд	нд
5	Нитрендипин	50	71,1±1,6	53,0±1,4	79,9±1,6	108,3±1,9	0,75	1,13	1,52	разнонаправ	5	1,801
6	Пропранолола г/х	200	77,0±1,8	< 10	< 10	74,2±1,6	0,02	0,02	0,95	усиливает	нд	нд
7	Валсартан	100	89,2±2,0	88,5±1,6	88,4±2,1	104,3±2,2	0,99	0,99	1,17	не влияет	нд	нд
8	Дофамина г/х	200	69,9±1,7	< 10	< 10	< 10	нд	нд	нд	усиливает	нд	нд
9	Торасемид	200	72,5±1,8	101,5±2,2	105,6±2,4	95,6±1,7	1,40	1,46	1,32	ослабляет	15	5,226
10	Индапамид	200	88,5±2,2	143,1±2,1	132,5±1,6	164,6±2,4	1,62	1,50	1,86	ослабляет	15	5,487
11	Ресвератрол	100	72,5±1,7	99,5±1,8	76,5±1,4	84,2±1,6	1,89	1,46	1,22	ослабляет	10	2,282
12	Мангиферин	100	63,5±1,6	117,2±1,6	90,0±2,0	64,5±0,9	1,85	1,42	1,02	ослабляет	10	4,223
13	Эмбинин	400	110,2±2,2	90,5±1,1	116,8±1,6	145,4±2,5	0,82	1,06	1,32	разнонаправ	25	15,165
14	Фумарат натрия	1500	82,5±2,0	185,6±2,3	138,4±2,2	113,1±1,7	2,25	1,68	1,37	ослабляет	90	14,404
15	Сукцинат натрия	1500	87,3±2,2	135,6±4,1	105,6±3,4	93,7±2,2	1,55	1,21	1,07	ослабляет	140	19,610
16	L-Малат натрия	700	89,1±1,6	168,1±3,2	114,6±2,0	98,4±1,9	1,89	1,29	1,10	ослабляет	65	11,573
17	Полигинан натрия	200	60,8±1,8	123,2±1,6	98,7±1,4	74,6±0,8	2,03	1,62	1,23	ослабляет	20	1,8×10 ⁵
18	Унитиол (референ.)	500	84,0±1,7	245,2±2,9	156,4±2,7	122,0±2,1	2,92	1,86	1,45	ослабляет	30	6,309
19	Растворитель препаратов	0	91,5±2,1	97,8±2,1	89,5±1,8	92,0±1,9	1,05	0,98	1,01	не влияет	нд	нд

Примечание: IC₅₀ – среднеингибиторная концентрация, нд – не детектируется, ПЦА – пороговая цитопротекторная концентрация

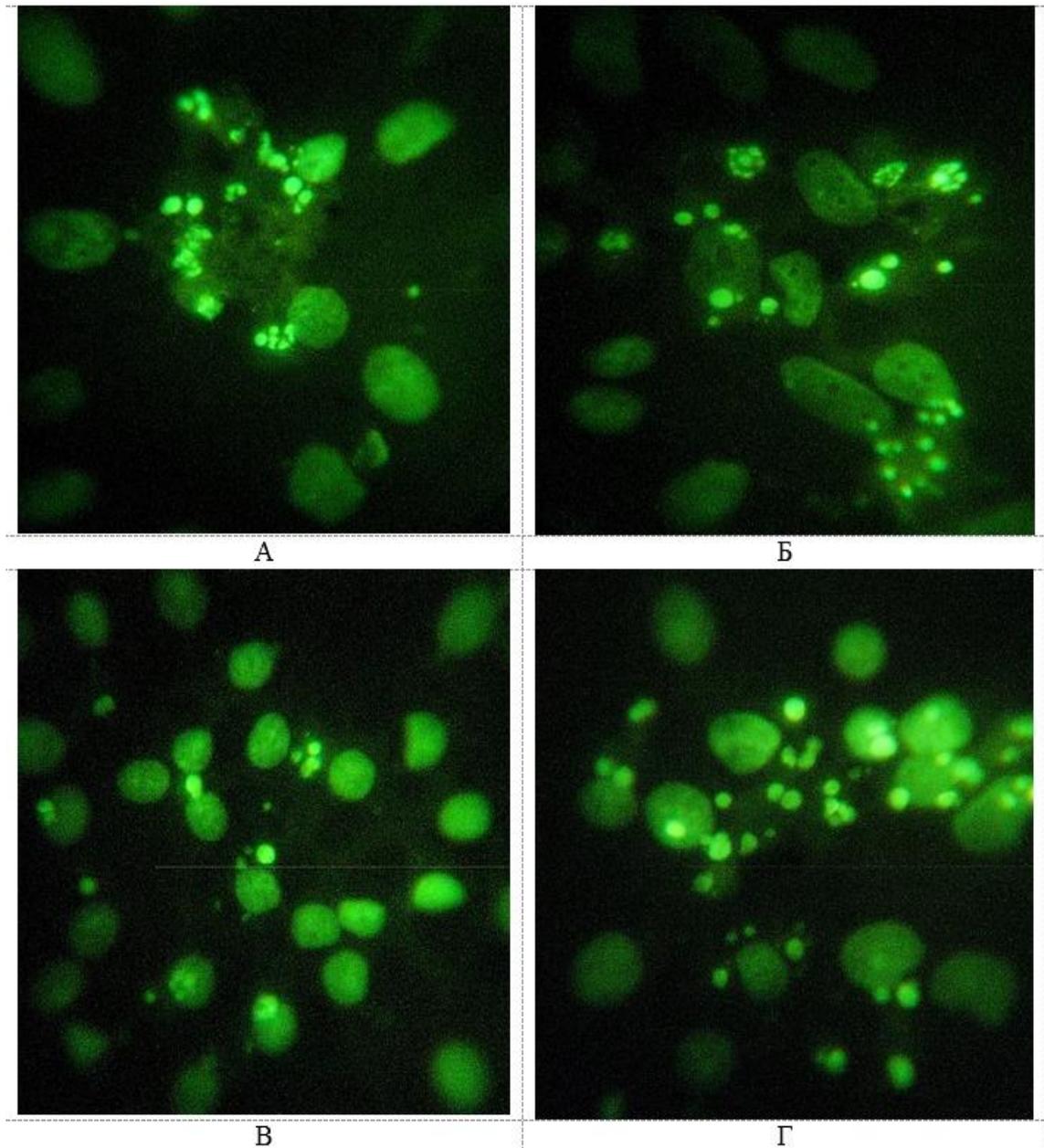


Рисунок 52 – Активация апоптоза клеток MDCK при инкубации с растворами типовых нефротоксинов уранил ацетата (А, Б) и гентамицина сульфата (В, Г) в контрольных лунках.

Окраска на апоптоз. Увеличение 600.

Эффективность фитопрепаратов, представляющих собой комплекс биологически активных веществ вторичных метаболитов высших растений, в условиях *in vitro* не проводили в связи с невозможностью отнести выявленные эффекты к какому-либо компоненту. Полученные результаты свидетельствовали о том, что для подбора средств терапии токсических нефропатий необходимо взвешенно оценивать значимость результатов опытов *in vitro* со всеми их ограничениями и проводить сопоставление с результатами экспериментов на животных.

Для ряда отобранных препаратов проводили тестирование их нефропротекторной активности на животных моделях. Сопоставимое нефропротекторное действие было установлено у животных для индапамида, торасемида и конфумина (таблица 30). Нитрендипин, мангиферин и ресвератрол не обеспечивали достижения статически достоверного снижения уровня креатинина крови и липокалина-2 в моче отравленных животных при профилактическом введении в силу недостаточной биодоступности в зоне действия нефротоксиканта или медленном опосредованном действии через клеточные сигнальные пути.

Таблица 30 – Нефропротекторная активность ряда лекарственных препаратов при токсической нефропатии у крыс (дихлорид ртути, 2 мг/кг)

Группы	N	Mean	SD	SEM	95% ДИ	p по тесту Данна
Креатинин крови, мкмоль/л						
интактные	8	80,2	10,6	3,8	71,3-89,2	-
контроль ОПП	8	247,9	82,7	29,2	178,7-317,0	< 0,0001
нитрендипин	8	176,4	45,8	16,2	138,1-214,7	нс
мангиферин	8	165,6	48,2	17,0	125,3-205,9	нс
ресвератрол	8	153,1	33,3	11,8	125,3-181,0	нс
индапамид	8	123,8	32,8	11,6	96,3-151,2	0,0383 к ОПП
торасемид	8	116,8	23,6	8,3	97,0-136,5	0,0227 к ОПП
конфумин	8	105,8	20,5	7,3	88,6-122,9	0,0023 к ОПП
Мочевой уровень u-NGAL, нг/мг креатинина						
интактные	8	613,1	182,2	64,4	460,8-765,4	-
контроль ОПП	8	2448,0	630,6	223,0	1921,0-2975,0	< 0,0001
нитрендипин	8	1500,0	298,5	105,5	1250,0-1749,0	нс
мангиферин	8	1270,0	354,5	125,3	973,3-1566,0	нс
ресвератрол	8	1402,0	577,9	204,3	918,3-1885,0	нс
индапамид	8	1007,0	214,2	75,7	827,5-1186,0	0,0103 к ОПП
торасемид	8	987,1	304,7	107,7	732,4-1242,0	0,0061 к ОПП
конфумин	8	919,3	239,4	84,6	719,1-1119,0	0,0022 к ОПП

Примечание: нс – незначительно. Множественные сравнения по тесту Данна

Наибольшим нефропротекторным действием обладал фумарат натрия (конфумин). Нитрендипин, мангиферин и ресвератрол, оказавшие выраженное цитопротекторное действие *in vitro*, не проявили нефропротекторной активности *in vivo* в профилактической схеме применения на данной экспериментальной модели.

Скрининг ряда инфузионных препаратов проводили на мышах при отравлении нефротоксичными веществами, превращающихся в процессе «летального» синтеза в более токсичные метаболиты. Изучаемые растворы вводили внутрибрюшинно мышам самцам в максимально возможном объеме 1,5 мл/10 г массы тела, унитиол – в дозе 50 мг/кг за 30 мин до введения ядов. Яды вводили однократно внутривентрикулярно. При интоксикации этиленгликолем,

ацетонитрилом, метанолом выживаемость определяли через сутки. При интоксикации цисплатином летальность определяли в течение 7 суток. Результаты представлены в таблице 31.

Выживаемость в контрольных группах составила 0%, за исключением интоксикации метанолом, где выживаемость контроля составила 20%. При интоксикации этиленгликолем выживаемость в группах составила: введение раствора Рингера – 40% (достоверно по сравнению с контролем), меглюмина натрия сукцинат – 78%, унитиола – 60% (различия в опытных группах достоверны по сравнению с контролем и р-ром Рингера). При интоксикации ацетонитрилом выживаемость в группах составила: введение раствора Рингера – 0%, меглюмина натрия сукцинат – 17%, унитиола – 25%. При интоксикации метанолом выживаемость в группах составила: введение раствора Рингера – 50% (достоверно по сравнению с контролем), меглюмина натрия сукцинат – 80% (достоверно по сравнению с контролем и р-ром Рингера), унитиола – 0% (достоверно по сравнению с контролем). На фоне интоксикации цисплатином выживаемость во всех группах терапии была равна 0%. Таким образом профилактическое введение сукцинат-содержащего препарата с антигипоксическим механизмом действия оказывало защитное действие при отравлении ацетонитрилом, этиленгликолем и метанолом.

Таблица 31 – Скрининг ряда препаратов при отравлении токсикантами, вызывающими ОПП

Токсикант/доза	Группы	Погибло/всего	Гибель, %	Выживаемость, %
Этиленгликоль, 10 мл/кг	контроль	4/4	100	0
	р-р Рингера	6/10	60*	40*
	меглюмина натрия сукцинат, 1,5%	2/9	22*/**	78*/**
	унитиол, 50	4/10	40*/**	60*/**
Ацетонитрил, 2,5 мл/кг	контроль	4/4	100	0
	р-р Рингера	7/7	100	0
	меглюмина натрия сукцинат, 1,5%	5/6	83*	17*
	унитиол, 50	6/8	75*	25*
Метанол, 12 мл/кг	контроль	8/10	80	20
	р-р Рингера	5/10	50*	50*
	меглюмина натрия сукцинат, 1,5%	2/10	20*	80*/**
	унитиол, 50	10/10	100*	0*
Цисплатин, 60 мг/кг	контроль	10/10	100	0
	р-р Рингера	9/9	100	0
	меглюмина натрия сукцинат, 1,5%	10/10	100	0
	унитиол, 50	9/9	100	0

Примечание: * отличия значимы по сравнению с контрольной группой; $p < 0,05$; ** отличия значимы по сравнению с группой терапии раствором Рингера; $p < 0,05$

Опасность данного терапевтического подхода заключается в том, что если период перехода в олигоанурическую фазу ОПП сокращается, то инфузируемые растворы могут способствовать перегрузке объема циркулирующей крови и развитию отёка лёгких и головного мозга. Перегрузка жидкостью может быть результатом чрезмерного введения жидкости или олигурии, или их комбинации. Введение жидкости, а не низкое выделение мочи было независимо связано с прогрессированием от ОПП I стадии до ОПП III стадии. Одна из ключевых проблем заключается в том, что эффекты перегрузки объёмом и эффекты ОПП похожи и оба фактора приводят к полиорганной недостаточности [459]. В связи с этим наибольшую перспективность представляют более концентрированные растворы метаболических корректоров, к которым относится 15% раствор фумарата натрия (конфумин).

Данные нефропротекторного действия фумарата натрия при токсических нефропатиях позволили предположить, что изучаемый препарат способен существенно ограничивать деструкцию нефротелиоцитов в условиях их аноксии. В исследовании применяли модель тепловой ишемии почки (ТИП), имеющую общие черты в патогенезе с токсическим ОПП. На модели ТИП у кроликов фумарат-опосредованная защита ренальной ткани характеризовалась уменьшением продукции биомаркеров, в т.ч. липокалина-2 и ограничением гиперазотемии. Эксперимент проводили совместно с хирургами-онкоурологами КБ Св. Луки (зав. 2 отделением урологии к.м.н. Гусейнов Р.Г.). Так, концентрация NGAL в крови у всех кроликов в первые 3 суток после ишемии-реперфузии длительностью 30 и 60 минут превышала предоперационные значения в 10 и 31 раза в группе без фармакотерапии и в 5 и 11 раз при введении фумарата натрия. Уровень NGAL нормализовывался на 21-е и 28-е сутки опыта. Уровень данного биомаркера в моче через 2 часа после ТИП превышало контрольные значения в 50 и 68 раз без терапии и в группах с применением фумарата натрия – в 23 и 37 раза. У животных с некорригированной ишемией, уровень NGAL в моче достигал контрольных предоперационных значений только при 30-ти минутной ТИП через 1 месяц после постановки опыта. В течение 72 часов после ТИП выражено повышалась концентрация в сыворотке крови биомаркера Kim-1: в 49 раз после 30 минут и в 65 раз после 60 минут ТИП. Показатель постепенно снижался без нормализации на завершающем сроке эксперимента. Введение фумарата натрия через 24 и 72 часа уровень Kim-1 в крови увеличивался в 27 и 41 раз ($p < 0,05$) соответственно. В моче уровень Kim-1 в первые 3 суток после ТИП превышал предоперационные значения в 24 и 27 раз, а затем регрессировал в две фазы – сначала быстро, а затем медленнее. У животных, получавших фумарат натрия, уровень Kim-1 в моче увеличивался в 9 и 12 раз, что достоверно отличалось от группы контроля патологии ($p < 0,05$). Нарастание креатинина в крови кроликов отставало от такового для биомаркеров NGAL и Kim-1, с максимумом на 7-е сутки. Позитивная динамика также отмечалась в отношении уровня ТБК-РП (1-3, 7 и 14 сутки) и активности лактатдегидрогеназы (3, 7 и 14

сутки) в крови животных. Фумарат натрия оказывал выраженное нефропротекторное действие на данной модели нефропатологии. Результаты биохимических исследований мочи и крови животных представлены на рисунках 53-58. В экспериментах на кроликах с тепловой ишемией почек, как ОПП ишемического генеза, фумарат натрия оказывал выраженное нефропротекторное действие. Фумарат натрия предотвращал деструкцию нефротелиоцитов, окклюзию просветов канальцев дебрисом, уменьшал выраженность биохимических признаков повреждения почечной паренхимы.

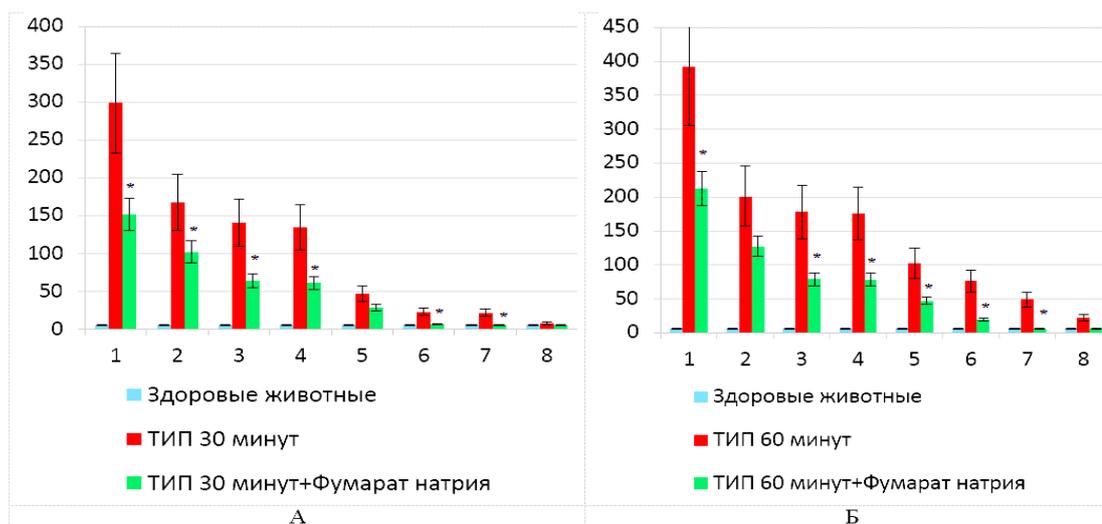


Рисунок 53 – Влияние фумарата натрия на уровень NGAL (нг/мл) в моче кроликов с ТИП 30 минут (А) и 60 минут (Б) через 2(1), 12(2), 24(3) и 72(4) часа и через 7 (5), 14 (6), 21 (7) и 28 (8) суток. * $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля ТИП.

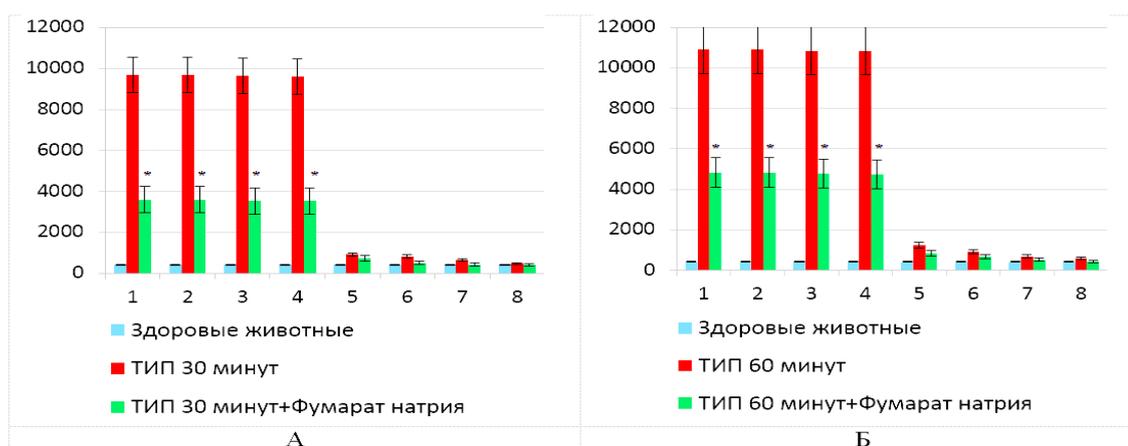


Рисунок 54 – Влияние фумарата натрия на уровень Kim-1 (пг/мл) в моче с ТИП 30 минут (А) и 60 минут (Б) у кроликов через 2(1), 12(2), 24(3) и 72(4) часа и через 7 (5), 14 (6), 21 (7) и 28 (8) суток. * $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля ТИП.

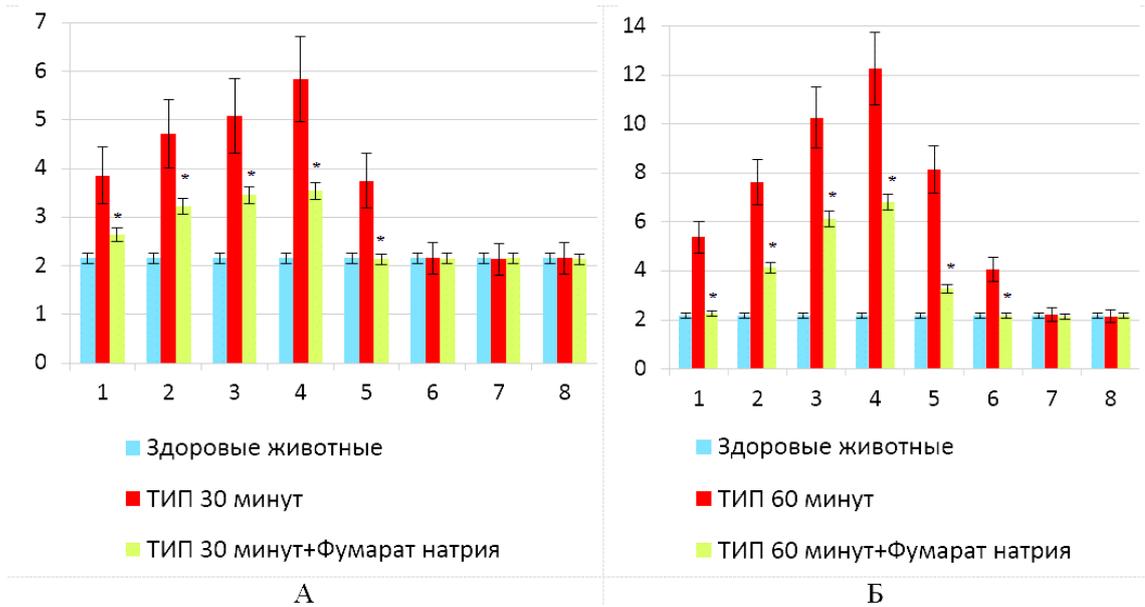


Рисунок 55 – Влияние фумарата натрия на содержание в сыворотке крови ТБК-РП (мкмоль/л) с ТИП 30 минут (А) и 60 минут (Б) у кроликов через 2(1), 12(2), 24(3) и 72(4) часа и через 7 (5), 14 (6), 21 (7) и 28 (8) суток. * $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля ТИП.

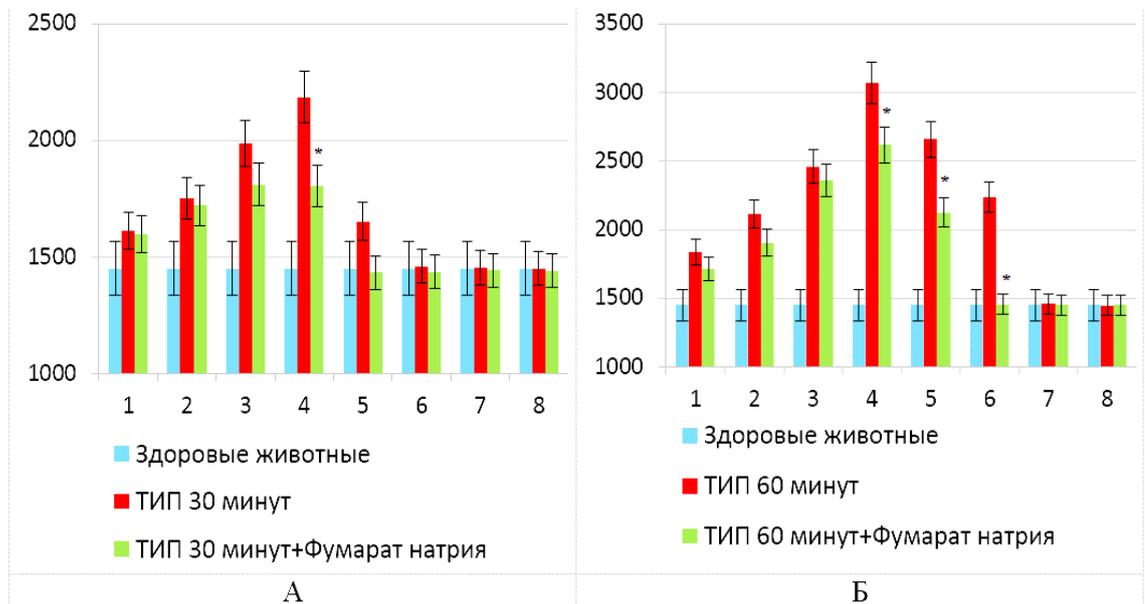


Рисунок 56 – Влияние фумарата натрия на активность ЛДГ (МЕ/л) в крови с ТИП 30 минут (А) и 60 минут (Б) у кроликов через 2(1), 12(2), 24(3) и 72(4) часа и через 7 (5), 14 (6), 21 (7) и 28 (8) суток. * $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля ТИП.

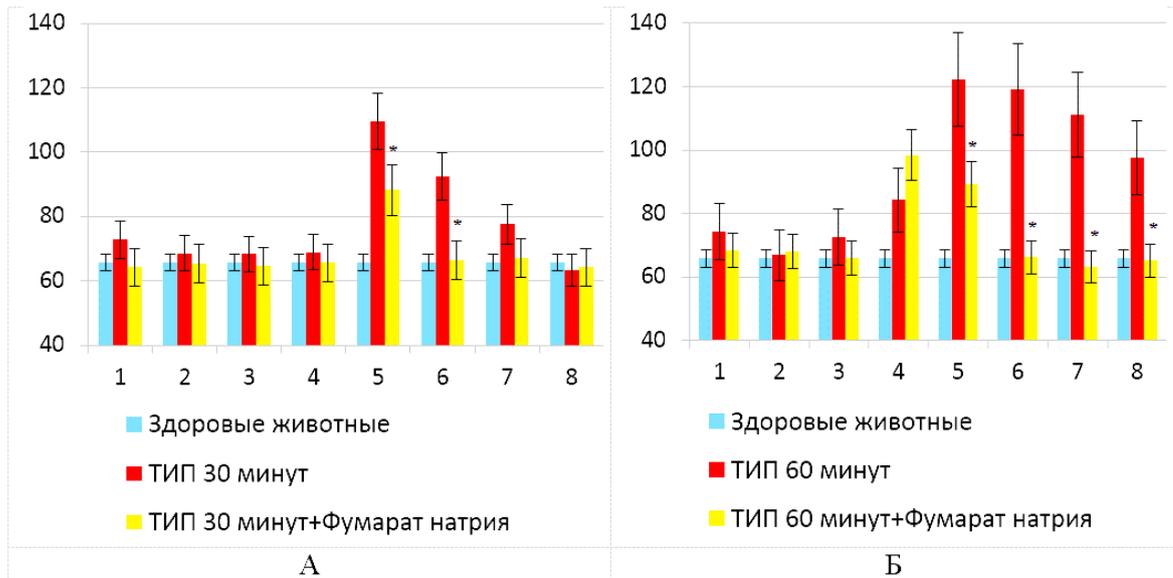


Рисунок 57 – Влияние фумарата натрия на уровень креатинина в сыворотке крови (мкмоль/л) с ТИП 30 минут (А) и 60 минут (Б) у кроликов через 2(1), 12(2), 24(3) и 72(4) часа и через 7 (5), 14 (6), 21 (7) и 28 (8) суток. * $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля ТИП.

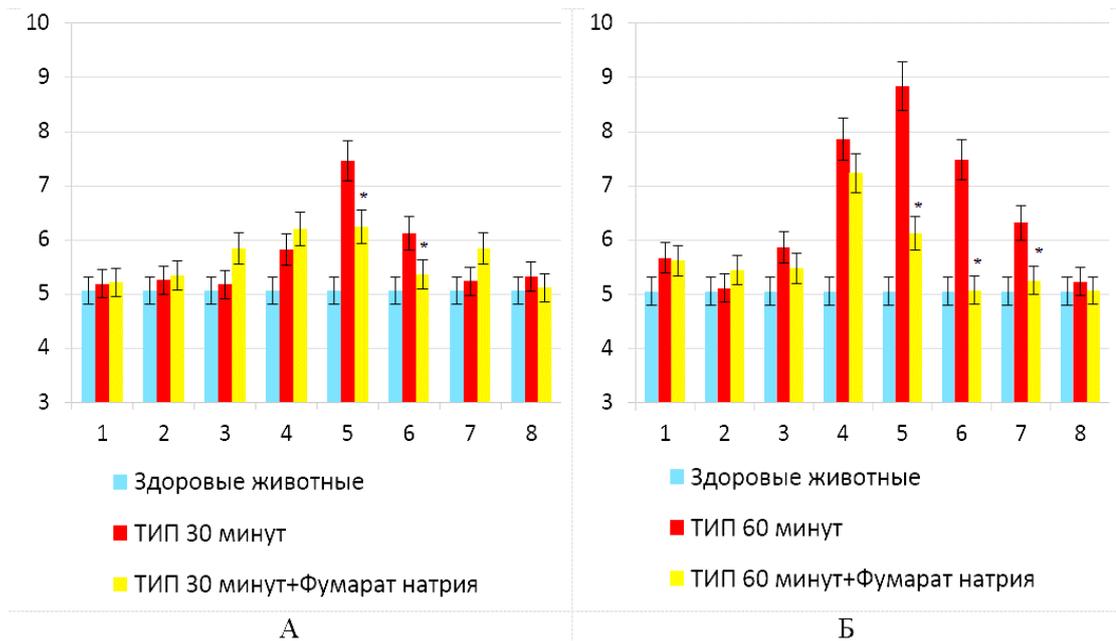


Рисунок 58 – Влияние фумарата натрия на уровень мочевины в сыворотке крови (ммоль/л) с ТИП 30 минут (А) и 60 минут (Б) у кроликов через 2(1), 12(2), 24(3) и 72(4) часа и через 7 (5), 14 (6), 21 (7) и 28 (8) суток. * $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля ТИП.

Фармакопрофилактическое действие фумарата натрия на модели ТИП у кроликов выражалось в предотвращении ишемического повреждения паренхимы почек животных, что сопровождалось меньшей степенью изменения биохимических признаков ОПП и накопления продуктов липопероксидации, чем в группах контроля. Полученные результаты свидетельствовали о высокой эффективности и патогенетической обоснованности применения данного препарата в качестве нефропротектора при токсических и ишемических вариантах ОПП.

Тестирование *in vitro* сорбционной ёмкости ряда энтеросорбентов, применяемых в токсикологической парктике и нефрологии, показало различную степень сорбции в отношении как токсичного металла, так и азотистых метаболитов. Результаты исследования представлены в таблице 32. В отношении сорбции *in vitro* ионов уранила $[UO_2^{2+}]$ из соли УАД энтеросорбенты располагались в ряду кроскармеллоза > полисорб > карболен > цеолит > альгинат + кроскармеллоза > энтеродез > энтеросгель. В отношении сорбции креатинина энтеросорбенты располагались в ряду карболен > полисорб > кроскармеллоза > альгинат + кроскармеллоза > энтеродез > цеолит > энтеросгель. В отношении сорбции мочевины активными были энтеросорбенты в ряду альгинат + кроскармеллоза > энтеросгель > цеолит. В отношении экзо- и эндотоксинов изученные сорбенты проявили различную степень связывания, что определяет поиск более индивидуальных подходов к их назначению при отравлении различными по химическому строению токсикантам. Полученные данные могут быть применены при разработке методов гемо- и плазмсорбции *ex vivo*, а также биохимических исследований.

Таблица 32 – Величина сорбционной ёмкости *in vitro* для ряда энтеросорбентов

Энтеросорбент	Связываемые вещества		
	УАД, ммоль/г	креатинин, ммоль/г	мочевина, ммоль/г
Карболен (уголь)	0,0264±0,0003	0,0977±0,0005	0
Энтеродез	0,0063±0,0001	0,0236±0,0003	0
Полисорб МП	0,0431±0,0004	0,0343±0,0004	0
Кроскармеллоза Na	0,0462±0,0003	0,0312±0,0002	0
Цеолит	0,0180±0,0002	0,0171±0,0001	0,0273±0,0008
Альгинат натрия + кроскармеллоза Na (2:1)	0,0095±0,0001	0,0270±0,0002	0,8384±0,0021
Энтеросгель влажный	0,0056±0,0002	0,0102±0,0003	0,8050±0,0018

Таким образом, в результате проведённого скрининга, для выбора эффективных средств терапии токсических нефропатий необходимо получение доказательств эффективности в экспериментах *in vitro* и у лабораторных животных с экспериментальной токсической нефропатией новых и уже используемых, но назначаемых по другим показаниям лекарственных средств.

4.2 Изучение антидотных свойств гидрокарбоната натрия при перитонеальном диализе

Гидрокарбонат натрия с соединениями VI-валентного урана образует сверхпрочные по константе диссоциации комплексы ($K_{stab} = 1,1 \times 10^{18}$), более прочные, чем с некоторыми хелатами [20, 34, 453, 533, 608]. Было установлено, что применение гидрокарбоната натрия (в качестве антидота) внутривенно при отравления ураном способствует положительному патоморфозу в почках за счёт уменьшения степени повреждения нефротелия канальцев, регрессии дистрофических процессов. Раствор дигидрата ацетата уранила ($UO_2(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) вводили крысам *Sprague-Dawley* однократно внутрибрюшинно в дозе 5,0 мг/кг. Крысам в течение 3 дней внутривенно вводили физиологический раствор натрия хлорида (ФР) и натрия гидрокарбонат, 3% раствор (антидот) в эффективной дозе 15 мл/кг после однократного введения уранил ацетата. Оценивали профилактическое в отношении развития острой почечной недостаточности действие препарата. На 5-е сутки всех животных подвергали плановой эвтаназии с тотальным забором крови и проведением вскрытия.

Применение антидота внутривенно приводило к нормализации уровня глюкозы и восстановлению активности ЛДГ в крови животных; способствовало снижению уровня мочевины крови, но незначительно влияло на уровень креатинина; способствовало снижению уровня средномолекулярных веществ и олигопептидов на эритроцитах ($p < 0,05$). Проведённая терапия увеличивала коэффициент элиминации веществ низкой и средней молекулярной массы вследствие ренопротективного действия, а также снижала суммарный индекс интоксикации более чем в 1,5 раза. Данные биохимических показателей крови при внутривенной терапии отравления ураном гидрокарбонатом натрия (антидотом) представлены в таблице 33. Следует отметить, что у части животных из групп терапии антидотом внутривенно были увеличены в размерах и массовом коэффициенте лёгкие, что свидетельствовало о риске развития их отёка.

Для изучения эффективности включения гидрокарбоната натрия в состав диализирующей среды был подготовлен состав диализирующего раствора Дианил (А) с добавлением гидрокарбоната натрия (Б) и проведены исследования его стабильности по физико-химическим параметрам (электропроводности и общего солесодержания – см. таблицу 34).

Крысы самцы линии *Sprague-Dawley* с массой тела 260-320 г. были разделены на группы: 1 группа – животные, получавшие УАД в дозе 20 мг/кг однократно внутрибрюшинно (в/б) (контроль, $n=8$); 2 группа – животные, получавшие УАД в дозе 20 мг/кг однократно в/б за 43 часа до начала стандартного ПД (раствор А) ($n=20$), 3 группа – животные, получавшие УАД в дозе 20 мг/кг однократно в/б за 43 часа до начала ПД с добавлением гидрокарбоната натрия (раствор Б) ($n=20$).

Таблица 33 – Влияние внутривенной терапии гидрокарбонатом натрия на показатели эндогенной интоксикации и метаболизма крыс при отравлении ураном

Показатели	Экспериментальные группы		
	интактные	УАД + ФР	УАД + натрия гидрокарбонат
МСМ 280 нм, у.е. плазма – эритроциты –	0,040±0,009 0,145±0,014	0,227±0,021* 0,216±0,014*	0,153±0,026* 0,166±0,009†
ВНиСММ, у.е. (интеграл) плазма – эритроциты –	2,047±0,171 6,214±0,497	7,676±0,529* 8,512±0,417*	5,740±0,770* 7,478±0,299*
Катаболический пул плазма – эритроциты –	0,512±0,053 1,672±0,148	1,216±0,092* 2,186±0,102*	1,173±0,158* 1,912±0,098
Олигопептиды, мг/мл плазма – эритроциты –	0,539±0,157 5,376±0,718	4,504±0,554* 8,610±0,522*	2,808±0,551* 6,529±0,536†
Расчётный коэффициент элиминации	1,004±0,098	0,502±0,028 p=0,004	0,620±0,045 p=0,004 p=0,037
Индекс интоксикации	36,17±5,97	110,38±14,74 p=0,004	67,59±8,83 p=0,0064 p=0,025
Глюкоза, ммоль/л	8,11±0,27	5,83±0,23*	7,70±0,35†
Лактат, ммоль/л	2,94±0,17	2,90±0,20	3,02±0,13
ЛДГ, МЕ/л	1945,3±136,53	1380,7±133,8*	1671,5±129,5
Мочевина, ммоль/л	7,46±0,43	43,20±1,50*	34,28±4,23*†
Креатинин, мкмоль/л	57,2±4,2	326,0±14,5*	255,8±52,1*
МК почек, мг/г	7,39±0,23	10,41±0,37*	9,07±0,36*†

Примечание: ниже данных Mean±SEM представлена значимость различий при p<0,05 (точное значение приведено под средними величинами); нд – не существенные различия; * отличия от 1 группы (интактные крысы) при p<0,05; † отличия от 2 группы (УАД) при p<0,05

Данные по группам терапии представлены в таблице 35. Динамика ультрафильтрации (Vex/Vin, отн.ед.) в группе животных, получавших диализ раствором А, характеризовалась среднечасовой скоростью 1,06 отн.ед. и линейным ростом от 1-го до 3-его сеанса (угол наклона линейной регрессии 40°) с выходом на плато к 4-му сеансу ПД (+27,4% ко 2-му сеансу, +41,1% к 3-му сеансу и +62,3% к 4-му сеансу). В группе крыс, получавших ПД раствором Б, динамика ультрафильтрации (Рисунок 59) характеризовалась средней скоростью 1,12 отн.ед., линейным

ростом от 1-го до 3-его сеанса (угол наклона линейной регрессии 70°) с выходом на плато к 3-му сеансу ПД (+48,7% ко 2-му сеансу, +68,5,1% к 3-му сеансу).

Таблица 34 – Физико-химические параметры диализирующих растворов

№ серии анализа	Раствор А – дианил		Раствор Б – дианил + гидрокарбонат натрия	
	ЕС	TDS	ЕС	TDS
1	13721	6717	16906	8453
2	13369	6684	16906	8453
3	13536	6768	16906	8453
4	13536	6768	17057	8528
5	13662	6831	16906	8453
6	13700	6850	16906	8453
7	13235	6817	17057	8528
8	13413	6806	17057	8528
9	13413	7006	17057	8528
10	13413	6806	17214	8607
Mean	13499,8	6805,3	16997	8498,4
SD	159,1	87,2	106,9	53,3
CV%	1,18	1,28	0,63	0,63
95% ДИ	13182-13818	6631-6980	16783-17211	8392-8605

Примечание: ЕС – электропроводность, мкСм/см³; TDS – общее солесодержание, мг/л; Mean – среднее арифметическое значение; SD – стандартное отклонение; CV% – коэффициент вариации 10-ти измерений; ДИ – доверительный интервал

Статистически достоверные различия в величине относительной ультрафильтрации отмечали при сравнении групп ПД раствором А, 1-й сеанс vs. (здесь и далее vs. = versus – в сравнении) ПД раствором Б, 3-й сеанс (p=0,026), ПД раствором А, 1-й сеанс vs. ПД раствором Б, 6-й сеанс (p=0,018), ПД раствором Б, 1-й сеанс vs. ПД раствором Б, 3-й сеанс (p=0,024), и ПД раствором Б, 1-й сеанс vs. ПД раствором Б, 6-й сеанс (p=0,016). Таким образом, существенных различий во влиянии растворов А и Б на величину ультрафильтрации в каждый сеанс диализа не было выявлено.

В качестве маркера адекватности перитонеального диализа была взята кинетика мочевины без учёта почечного клиренса мочевины. Доля снижения уровня мочевины (URR%) составила более 60-65%, что характеризовало достаточную эффективность метода ПД для лечения ОПП токсического генеза. Полученные результаты представлены на рисунке 60. Так, в группе крыс, получавших ПД раствором А, величина URR в 1-е сутки составила 64,8%, что рассматривалось как адекватный режим диализа. При наблюдении на 3-е сутки величина URR несколько снижалась и составила 57,8%, а при наблюдении на 7-е сутки снова увеличивалась до 68,5%. В

группе крыс, получавших ПД раствором Б, величина URR стабильно сохранялась на уровне более 65% и составила 65,4% в 1-е сутки, 65% в 3-е сутки и 69,1% на 7-е сутки наблюдения в пределах стандартного отклонения. При этом статистически значимые различия были выявлены только при сравнении групп ПД раствором А, 3-е сутки vs. ПД раствором Б, 7-е сутки ($p=0,029$). Адекватным считается диализ у людей при значениях Kt/V по мочеvine не меньше 1,7-2,0. Фактическая доза диализа раствором Б была сопоставима с таковой для диализа (3,1 vs. 3,3, $p=0,486$), приближалась к критическому значению больше 1,2-1,4 Kt/V по медиане для 7-го дня наблюдения и не имела существенных различий с таковой для раствора А при сравнении в каждый день эксперимента (1-7-е сутки), за исключением пары ПД раствором А, 3-е сутки vs. ПД раствором Б, 7-е сутки ($p<0,05$).

Таблица 35 – Deskриптивные статистики сравниваемых групп крыс (Mean±SEM) и результаты непараметрической оценки (тест Манна-Уитни) эффективности диализа

Показатели	Экспериментальные группы		Уровень значимости p
	терапия раствором А	терапия раствором Б	
Масса тела, г	283,7±6,8	293,8±9,1	0,515
Вводимый объем, мл/сеанс	28,3±0,7	29,5±1,0	0,422
Слив диализата 1, мл/сеанс	21,0±1,3	21,7±1,5	0,600
Слив диализата 2, мл/сеанс	26,8±2,8	32,2±1,5	0,225
Слив диализата 3, мл/сеанс	29,7±3,3	36,5±1,7	0,193
Слив диализата 4, мл/сеанс	33,7±2,6	34,0±2,5	0,971
Слив диализата 5, мл/сеанс	34,0±1,8	35,0±1,2	0,829
Слив диализата 6, мл/сеанс	34,2±2,2	37,7±0,6	0,314
Слив диализата (сумма), мл	145,5±27,8	161,6±23,7	0,567
Мочевина крови до ПД, ммоль/л	37,9±3,5	37,3±3,1	1,000
Мочевина крови после ПД, ммоль/л	11,7±1,2	11,4±1,3	0,829
Выведено мочевины, ммоль/сут	5,5±0,9	5,9±0,6	0,913
Диализная доза, Kt/V	3,3±0,1	3,1±0,1	0,486

Сравнительный анализ эффективности удаления изотопа [^{238}U] из организма за 6 сеансов ПД к 48 часам после отравления показал, что раствор Б приводит к значимому увеличению скорости выведения токсичного элемента по данным перитонеального клиренса $\text{PCI}^{[238\text{U}]}$ на 276,2% ($p=0,0286$ по критерию Манна-Уитни) по сравнению с раствором А (Рисунок 61). Измерение уровня урана проводили методом ICP-MS/MS.

Результаты теста Мантела-Кокса показали, что терапия ПД с добавлением гидрокарбоната натрия (раствор Б) способствовала достоверному увеличению постдиализной выживаемости крыс (погибло 4 из 20, $p=0,0018$ по сравнению с группой негативного контроля, $p=0,0425$ по сравнению с диализом раствором А), что соотносилось с величиной перитонеального клиренса изотопа [^{238}U]. Данные отражены на рисунке 62.

Концентрация мочевины в крови отравленных крыс в премортальный период превышала 40 ммоль/л. При вскрытии погибших крыс из всех экспериментальных групп были отмечены одинаковые признаки: гипергидратация лёгких, дилатация камер сердца, отёк головного мозга, развившиеся вследствие симметричного кортикального некроза почек (почечный вариант танатогенеза). В настоящем исследовании было установлено, что при базально высоком уровне мочевины эффективность метода интракорпорального очищения не способствует увеличению выживаемости из-за индивидуальной повышенной восприимчивости некоторых особей крыс к действию данного нефротоксина.

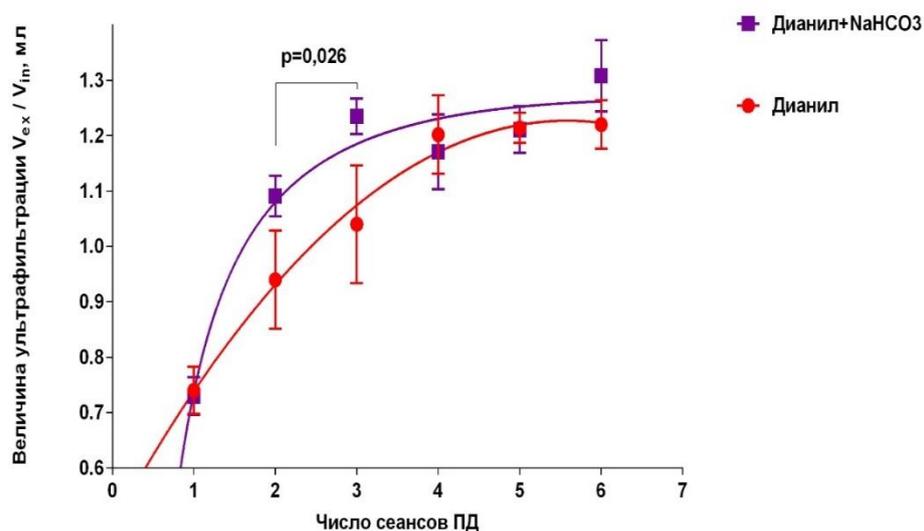


Рисунок 59 – Влияние добавления гидрокарбоната натрия к дианилу в режиме «острого» перитонеального диализа на динамику ультрафильтрации.

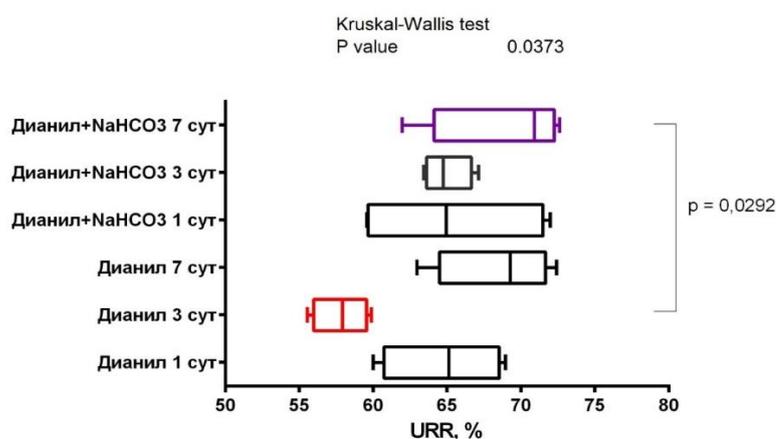


Рисунок 60 – Различия во влиянии растворов на долю снижения уровня мочевины в крови (URR %) до и после диализа у крыс в период до 7 суток после проведения «острого» перитонеального диализа.

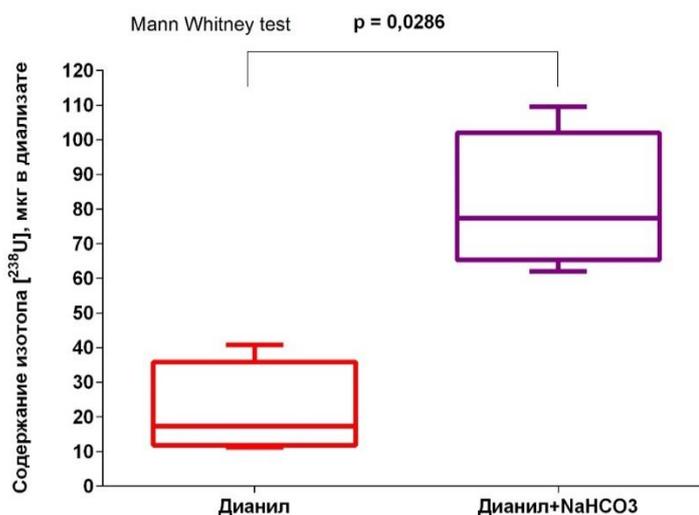


Рисунок 61 – Перитонеальный клиренс изотопа [^{238}U] при проведении ПД раствором А (дианил) и раствором Б (дианил + натрия гидрокарбонат). Критерий Манна-Уитни.

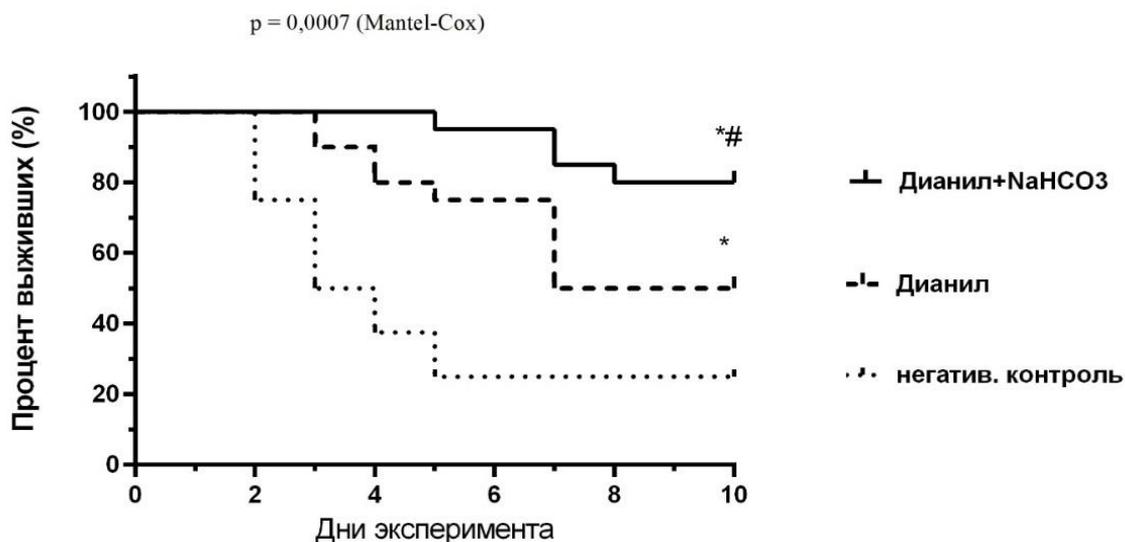


Рисунок 62 – Графики выживаемости Каплана-Мейера для сравниваемых групп крыс (примечание: * отличия от негативного контроля; # отличия от раствора дианил).

Метод перитонеального диализа с включением гидрокарбоната натрия показал высокую эффективность у крыс при отравлении нефротоксичным соединением урана. Доступность брюшины как полупроницаемой мембраны и проведение сеансов в «остром» режиме способствовало большей элиминации циркулирующей концентрации ионов уранила в

гипертоническую среду диализирующего раствора как по градиенту, так и за счёт образования сверхпрочных комплексов с ионами гидрокарбоната, применяемого в составе раствора для перитонеального диализа. Эффективность выражалась в увеличении перитонеального клиренса токсина, предупреждении роста азота мочевины и, как следствие, увеличении постдиализной выживаемости крыс.

Полученные результаты продемонстрировали, что метод терапии, основанный на включении в состав диализирующего раствора антидота гидрокарбоната натрия, способствует увеличению доли удаляемого урана [^{238}U] из организма животных на 276,2%, а также повышению уровня выживаемости отравленных животных. Подобного метода включения антидота в состав диализирующего раствора для проведения перитонеального диализа ранее не встречалось в современной научной литературе.

Таким образом, нами доказано, что антидот гидрокарбонат натрия повышает эффективность перитонеального диализа в случае острого отравления нефротоксичными соединениями урана.

4.3 Изучение детоксицирующих свойств диметилкоксобутилфосфонилдиметилата

При отравлениях ацидотическими ядами и лекарственными средствами, вызывающими развитие метаболического ацидоза (метанол, этиленгликоль (ЭГ), салицилаты, ибупрофен, нитропруссид натрия, гербициды группы хлорфеноксикислот) [86, 363], формируется эксикоз и в раннюю фазу необходимо вводить кристаллоиды, препараты с антигипоксическими и антиоксидантными свойствами для обеспечения защиты тканей от токсического действия метаболитов ЭГ. При сопоставлении выявленных изменений в органах, функции которых остро критичны для жизнедеятельности, установлено, что ЭГ в токсических дозах оказывает комплексное нейротоксическое, нефротоксическое и кардиодепрессивное действие, рабдомиолиз [13, 57], к которым может присоединяться старвационный кетоацидоз [428].

В неотложной терапии различных заболеваний с выраженным метаболическим ацидозом наряду с натрия гидрокарбонатом назначают димефосфон (ДМФ), обладающий антиацидотической, мембраностабилизирующей, противовоспалительной и антиоксидантной активностями [17, 45]. Анализ фармакодинамических свойств ДМФ показал, что он оказывает кардиопротективное и нейропротективное действие, благодаря чему может позитивно влиять на вызванные отравлением нарушения КОС и функции почек у крыс. Тем не менее, эффективность его применения для терапии отравлений ЭГ ранее не изучали.

На модели острого отравления этиленгликолем (ЭГ) была изучена эффективность димефосфона (ДМФ) как лекарственного средства в сравнении со стандартной антидотной терапией (САТ) для коррекции метаболического ацидоза и нефропротекции. Результаты отражены в таблице 36 и на рисунке 63.

Клиническая картина отравления в первые 2 ч у крыс из всех опытных групп была однотипной: «опьянение», нарушение координации движений, походки, увеличение частоты дыхательных экскурсий. В группе САТ отмечено уменьшение двигательной активности и частоты дыхания в сравнении с крысами, не получавшими терапии. Терапия ДМФ после первой дозы усиливала атаксию, но затем поведение животных становилось более упорядоченным. Нефротоксическое действие ЭГ характеризовалось начальным подъёмом уровня креатинина в 2,2 раза, мочевины в 2 раза, магния в 1,7 раза, что свидетельствовало об остром нарушении фильтрационной функции почек без гиперкалиемии (снижение клиренса креатинина в 4 раза, $p = 0,0005$), умеренным снижением бикарбонатов. При этом соотношение креатинина в моче и крови не успело претерпеть статистически достоверного изменения. Было зарегистрировано развитие гипокальциемии ($p = 0,0076$), связанной, вероятно, с образованием оксалата кальция и его осаждением в органах-мишенях. Выявлено умеренное снижение уровня альбумина ($p = 0,0004$).

САТ ограничивала развитие гипермагнеземии, лактатацидоза, увеличение уровня мочевины. Экспериментальная терапия частично ограничивала нарастание энергодефицита и снижала уровень d-3-гидроксибутирата (САТ – на 52%, димефосфон – ДМФ – на 40%). ДМФ в дозе 150 мг/кг 3 раза (450 мг/кг/сут) в течение первых суток при остром отравлении ЭГ благотворно влиял на рН и уровень бикарбонатов. В отношении увеличенной активности лактатдегидрогеназы (в 2,46 раза, $p=0,0012$) введение ДМФ, в отличие от САТ, приводило к умеренному снижению активности фермента (на 35%), носившего характер отчетливой тенденции ($p=0,1337$). ДМФ предотвращал снижение клиренса эндогенного креатинина.

Так, известно что антиацидотическое действие диметилкобобутилфосфонилдиметилата реализуется за счет почечного механизма регуляции кислотно-щелочного состояния: ускорения реабсорбции бикарбонатов и активации процессов ацидо- и аммиогенеза в почках, что вызывает повышение сниженного рН, уменьшение дефицита буферных оснований, понижение парциального давления углекислого газа и увеличение количества бикарбонатов крови. ДМФ нормализует углеводный обмен в цикле Кребса и интенсифицирует распад глюкозы по пентозному циклу [17, 45].

Было установлено, что ДМФ, вводимый в токсикогенную фазу, оказывал антиацидотическое действие и способствовал сохранению функции мочеобразования, вероятно путём нормализации энергетических процессов в тканях-мишенях токсического действия ЭГ и

его метаболитов, в том числе за счет антиацидотического и мембраностабилизирующего действия. ДМФ существенно ограничивал подъем пула неизмеряемых анионов в крови отравленных крыс, что выражалось в снижении величин анионной разницы (в 2 раза $p=0,042$, альбумин-корректированной анионной разницы $p=0,013$), ΔpH (в 1,9 раза), ΔAG (в 2,8 раза), ΔGap (в 3,5 раза) за счет интенсификации ренального и дыхательного механизмов регуляции КОС. ДМФ ограничивал степень осмотического некроза клеток проксимальных канальцев (процентную долю осмотической гибели нефротелиоцитов, вычисленную в среднем на 1 проксимальный каналец интракортикального нефрона). Выявленные эффекты превосходили таковые от применения САТ этанолом и натрия гидрокарбонатом, что открывает перспективу для применения димефосфона и других антиацидотических лекарственных средств в лечении отравлений ядами, вызывающими метаболический ацидоз с высокой анионной разницей.

Таблица 36 – Биохимические параметры крови крыс при остром отравлении ЭГ через 24 часа после проведения антидотной терапии и введения димефосфона (Mean \pm SEM)

Показатели	Экспериментальные группы крыс (n=6 в каждой)			
	интактные	ЭГ	ЭГ + САТ	ЭГ + ДМФ
С1 креатинина, мл/мин	0,78 \pm 0,08	0,19 \pm 0,03*	0,33 \pm 0,07*	0,46 \pm 0,05
Мочевина, ммоль/л	6,0 \pm 0,7	12,3 \pm 0,6*	9,5 \pm 0,8	8,8 \pm 0,8
Креатинин, мкмоль/л	69,7 \pm 8,0	159,7 \pm 20,5*	129,5 \pm 15,8*	97,5 \pm 4,7
pH крови, ед.	7,34 \pm 0,14	6,93 \pm 0,07*	7,01 \pm 0,10	7,15 \pm 0,05
Натрий, ммоль/л	146,5 \pm 2,2	140,8 \pm 0,6	143,7 \pm 2,6	142,5 \pm 1,8
Калий, ммоль/л	6,1 \pm 0,4	6,2 \pm 0,7	6,9 \pm 0,3	5,7 \pm 0,3
Хлориды, ммоль/л	108,0 \pm 1,8	87,3 \pm 2,0*	96,0 \pm 2,2	98,7 \pm 1,6
Бикарбонаты, ммоль/л	28,0 \pm 0,4	24,0 \pm 0,8*	24,5 \pm 0,8*	26,3 \pm 0,7
d-3-НВА, мкмоль/л	29,7 \pm 5,7	351,7 \pm 42,3*	167,0 \pm 24,0*#	209,7 \pm 62,5*
Лактат, ммоль/л	0,7 \pm 0,1	2,6 \pm 0,4*	1,7 \pm 0,2	1,5 \pm 0,3
ЛДГ общая, Е/л	400,2 \pm 77,5	984,4 \pm 76,8*	864,8 \pm 82,4*	640,6 \pm 61,9
ΔpH , у. ед.	0,06 \pm 0,16	0,47 \pm 0,07	0,39 \pm 0,10	0,25 \pm 0,05
ΔAG , ммоль/л	0,5 \pm 2,2	21,2 \pm 2,3*	13,2 \pm 1,8*	7,5 \pm 1,3#
ΔHCO_3 , ммоль/л	2,0 \pm 0,4	7,7 \pm 1,2	5,5 \pm 0,8	3,7 \pm 0,7
$\Delta AG/\Delta HCO_3$, у. ед.	1,0 \pm 1,0	2,9 \pm 0,4	2,7 \pm 0,5	2,6 \pm 0,8
ΔGap , ммоль/л	-1,5 \pm 2,6	13,5 \pm 1,9*	7,7 \pm 1,9	3,8 \pm 1,7#

Примечание: * отличия значимы по сравнению с группой интактных крыс при $p<0,05$;

отличия значимы по сравнению с группой отравленных ЭГ крыс при $p<0,05$; расчетные параметры КОС и метаболического ацидоза (см. Материалы и методы, раздел 2.2.10)

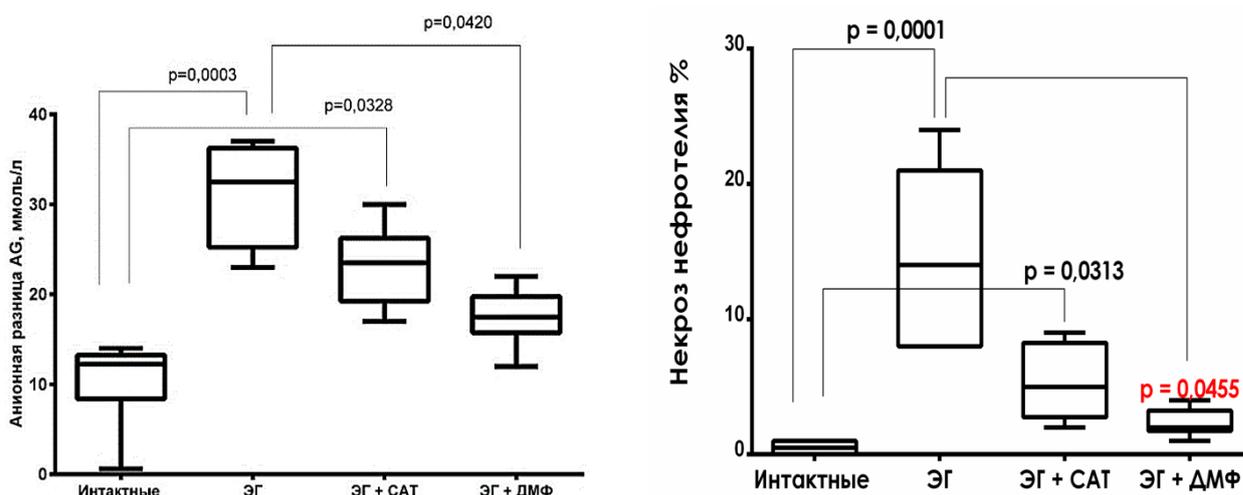


Рисунок 63 – Влияние стандартной антидотной терапии (САТ) и димефосфона (ДМФ) на анионную разницу АГ в крови у крыс (слева) и степень осмотического некроза нефротелиоцитов (справа) при отравлении этиленгликолем.

4.4 Изучение эффективности фитопрепаратов при токсических нефропатиях

Другим подходом к нефропротекторной фармакотерапии является применение растительных средств для профилактики осложнений химиотерапии, например, при введении цитостатика цисплатина. Основные группы биологически активных веществ, обуславливающих нефропротекторную активность фитопрепаратов, составляют антоцианы, иридоиды, органические кислоты (кофейная, розмариновая, фумаровая), полисахариды, флавоноиды [70]. Нефропротекторная и диуретическая активность многих из них экспериментально доказана на моделях различных нефропатий. При выборе лекарственного растительного сырья для поиска нефропротекторного препарата было учтено, что экстракт из *Solidago virgaurea* модулировал уровень провоспалительных цитокинов IL-1 α , IL-10, IL-15 в культуре фибробластов, а его основные флавоноиды уменьшали экспрессию SASP в ткани почек стареющих крыс [374, 563]. Нефропротекторное действие гранулята композиции экстрактов из трав *Solidago sp.*, *Agrimonia sp.* и *Bidens sp.* (далее ГКЭ, 50 и 100 мг/кг/сут) оценивали на модели цисплатиновой нефропатии. Результаты экспериментальной терапии представлены в таблице 37.

Препарат хофитол из ЛРС артишока *Cynara scolimus* и ГКЭ оказывали позитивное фармакодинамическое действие, которое проявлялось в уменьшении гиперазотемии, лейкоцитурии и нефрофиброза, а также уровня продуктов глубокого окисления белков (АОРР)

за счет входящих в их состав флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, танинов и тритерпеновых сапонинов. При гистологическом исследовании срезов почек крыс было установлено уменьшение степени интерстициального фиброза на 21-45% по сравнению с контрольной группой животных, получавших только цисплатин. По совокупности выявленных позитивных эффектов гранулят композиции экстрактов из трав *Solidago spp.*, *Agrimonia spp.* и *Bidens spp.* ограничивал прогрессирование фиброза почечной ткани и снижал интенсивность оксидативного стресса при цисплатиновой нефропатии. Нефрозолид, как и ГКЭ, в своём составе содержит в качестве доминирующего компонента экстракт Золотарника. Сравнение нефропротекторной активности официальных растительных фитопрепаратов нефрозолид (ГЛФ капли, 1 мл/кг/сут), хофитол (ГЛФ раствор для приёма внутрь, 1 мл/кг/сут), канефрон Н (ГЛФ капли, 1 мл/кг/сут) при токсической нефропатии, вызванной пятикратным с интервалом в 1 неделю введением дихлорида ртути (0,25 мг/кг на 1, 7, 14, 21, 28 сут п/к), показало, что максимальной эффективностью обладали препараты нефрозолид и хофитол; несколько менее выраженной – канефрон Н. Данные отражены в таблице 38.

Фармакотерапия растительными препаратами нефрозолидом, хофитолом и канефроном Н за счет противовоспалительного действия (снижение уровня МСР-1 мочи, Kim-1 в моче) оказывала нефропротекторное действие.

Все исследованные нами фитопрепараты статистически достоверно снижали выделение с мочой моноцитарного хемотаксического белка-1 – маркера воспалительной инфильтрации и профиброгенного цитокина. Преимуществом полученных впервые результатов стало научно обоснованное доказательство предотвращения или существенного ограничения исследованными средствами развития последствий ОПП токсического генеза – косвенного показателя моноцитарной инфильтрации (МСР-1 в моче) и прямого показателя роста коллагеновых волокон в тубулоинтерстиции почек. Препараты существенно ограничивали сморщивание почек, обусловленное развитием ХБП, и рост перитубулярного коллагена в корковом слое почек крыс (нефрозолид >> хофитол = канефрон Н).

Анализ полученных результатов показал, что применение растительных нефропротекторов является экспериментальным патогенетически обоснованным подходом к терапии токсических нефропатий, в частности предотвращении перехода ОПП в ХБП и может быть рекомендован для дальнейших до- и клинических исследований, получения доказательств безопасности и эффективности.

Результаты данных экспериментов позволяют заключить, что для фармакологической коррекции нефропатий токсического генеза необходимо подбирать препараты с учетом наличия антиоксидантных, антигипоксических, мембраностабилизирующих свойств и установленным

механизмом действия в части их первичной фармакодинамики и влияния на нарушенные при ОПШ параметры кислотно-основного состояния.

Таблица 37 – Нефропротекторная активность композиции экстрактов (n=6 в каждой группе)

Показатель	Экспериментальные группы				
	интактные	контроль (цисплатин)	+ хофитол, 100 мг/кг	+ ГКЭ, 50 мг/кг	+ ГКЭ, 100 мг/кг
В сыворотке крови					
Креатинин, мкмоль/л	54,5±5,7	163,3±15,5 p1=0,004	101,5±6,1 p1=0,004 p2=0,025	160,2±12,6 p1=0,004	89,7±6,1 p1=0,006 p2=0,013
Мочевина, ммоль/л	4,3±0,3	10,1±0,5 p1=0,004	7,6±0,7 p1=0,004 p2=0,020	9,2±0,8 p1=0,004	7,7±0,4 p1=0,004 p2=0,010
АОРР, мкмоль/л	62,8±7,0	232,5±15,1 p1=0,004	144,3±13,5 p1=0,004 p2=0,025	165,5±21,9 p1=0,004 p2=0,034	102,5±8,7 p1=0,004 p2=0,006 p3=0,020
В моче					
Сl креатинина, мл/мин/кг	3,35±0,21	1,47±0,14 p1=0,004	1,90±0,09 p1=0,004 p2=0,024	1,47±0,10 p1=0,004	2,13±0,11 p1=0,004 p2=0,010
NGAL, нг/мл	44,5±4,1	393,8±34,7 p1=,0007	224,8±19,7 p1=0,0006 p2=0,0038	339,7±21,5 p1=0,0002 p2=0,502	192,2±11,3 p1=0,0005 p2=0,0222 p3=0,772
Гликозамино- гликаны, мг/л	26,2±3,7	118,8±14,3 p1=0,004	70,3±8,0 p1=0,004 p2=0,025	75,8±8,6 p1=0,004 p2=0,024	55,2±6,0 p1=0,004 p2=0,013 p3=0,042
Растворимый коллаген, мг/л	8,0±2,4	274,3±43,1 p1=0,004	190,7±20,6 p1=0,004 p2=0,042	255,8±37,0 p1=0,004	185,8±30,5 p1=0,004 p2=0,034
В ткани почек					
Нефрофиброз, % площади	6,2±1,5	69,5±8,1 p1=0,004	48,2±5,9 p1=0,004 p2=0,047	55,8±3,0 p1=0,004	46,8±4,7 p1=0,004 p2=0,046

Примечание: p1 – по сравнению с группой интактных крыс; p2 – по сравнению с группой крыс с патологией; p3 – по сравнению с группой крыс, получавших терапию препаратом хофитол; АОРР – продукты глубокого окисления белков, Сl – клиренс, NGAL – липокалин-2

Таблица 38 – Нефропротекторная активность курсового введения фитопрепаратов (60 дней)

Группы	N	Mean	SD	SEM	95% ДИ	р по тесту Данна
Креатинин крови, мкмоль/л						
Интактные	6	76,6	4,7	1,9	71,7-81,6	-
Контроль (пат.)	6	353,3	92,5	37,8	256,2-450,4	0,0001 к инт.
Нефрозолит	6	181,6	21,0	8,6	159,5-203,6	0,0435 к конт.
Хофитол	6	239,4	27,7	11,3	210,4-268,5	0,0132 к инт.
Канефрон Н	6	243,9	100,3	40,9	138,6-349,2	нс
Мочевой уровень α -Kim-1, нг/мг креатинина						
Интактные	6	0,14	0,06	0,03	0,07-0,21	-
Контроль (пат.)	6	5,52	1,05	0,43	4,42-6,63	0,0001 к инт.
Нефрозолит	6	0,96	0,36	0,14	0,59-1,33	нс
Хофитол	6	0,92	0,47	0,19	0,42-1,41	нс
Канефрон Н	6	0,88	0,53	0,22	0,32-1,42	нс
Мочевой уровень α -MCP-1, пг/мг креатинина						
Интактные	6	2,05	0,67	0,27	1,35-2,75	-
Контроль (пат.)	6	17,23	2,98	1,22	14,11-20,36	0,0388 к инт.
Нефрозолит	6	2,22	1,40	0,57	0,74-3,69	0,0146 к конт.
Хофитол	6	2,07	0,73	0,30	1,30-2,83	0,0477 к конт.
Канефрон Н	6	2,02	0,68	0,28	1,31-2,73	0,0349 к конт.
МК почек, мг/г						
Интактные	6	7,12	0,53	0,22	6,56-7,68	-
Контроль (пат.)	6	4,50	0,46	0,19	4,02-4,98	0,0299 к инт.
Нефрозолит	6	7,07	1,51	0,61	5,48-8,65	0,0164 к конт.
Хофитол	6	7,57	0,87	0,35	6,65-8,48	0,0040 к конт.
Канефрон Н	6	6,70	0,46	0,19	6,22-7,18	нс
Перитубулярный нефрофиброз, % площади						
Интактные	6	5,75	2,24	0,91	3,40-8,10	-
Контроль (пат.)	6	35,33	12,39	5,06	22,33-48,33	0,0001 к инт.
Нефрозолит	6	11,53	5,10	2,08	6,18-16,89	0,0334 к конт.
Хофитол	6	14,22	4,04	1,65	9,97-18,46	нс
Канефрон Н	6	16,18	7,92	3,23	7,87-24,50	нс

Примечание: N – выборка; Mean – среднее значение; SD – стандартное отклонение; SEM – ошибка среднего значения; ДИ – доверительный интервал; МК – массовый коэффициент; р – уровень значимости

4.5 Заключение к главе 4

Экспериментальное обоснование подходов к фармакотерапии токсических нефропатий основывается на установлении эффективности реносберегающих средств, применении антидотов и хелаторов, методов заместительной почечной терапии для ускорения элиминации

токсинов из организма [2, 7-9, 13, 25, 34, 40, 43, 44, 48, 52, 63, 77, 137]. В связи с высокой потребностью почек в кислороде и макроэргических соединениях, глутатионе и жирных кислотах для метаболизма простаноидов препаратами выбора должны служить антигипоксанты, антиоксиданты и источники энергии для клеток почечной ткани [62, 82, 96, 103, 321, 391, 555, 561, 615], а также методы и препараты направленного действия для ограничения распространения клеточной гибели, поддержания функционального почечного резерва, предотвращения последствий токсической нефропатии [98, 187, 305, 362, 457, 463]. Методы интенсивной детоксикационной терапии значительно пролонгируют терминальные состояния, показывают положительную динамику токсических нефропатий [59]. Важным аспектом фармакотерапии является ограничение поступления жидкости из-за риска перегрузки ОЦК и развития фатальных последствий [41, 55, 61-63, 330, 459, 576].

В представленном диссертационном исследовании тестирование ряда лекарственных препаратов и фармакологических зондов на культуре почечного эпителия показало их разнонаправленное действие, что с одной стороны объясняет отсутствие зарегистрированных нефропротекторов, а с другой определяет путь дальнейшего поиска данного вида фармакотерапевтических средств. Для достижения клинической эффективности препаратов необходимо соотносить их цитопротекторные концентрации *in vitro* с создаваемыми в результате фармакокинетики концентрациями в крови и ткани почек, учитывать пути их реабсорбции, секреции, возможной конкуренции с нефротоксинами за места (рецепторы) связывания, а также влияния на системную гемодинамику и микроциркуляторное русло внутрпочечных сосудов. Из ряда препаратов, оказавших цитопротекторное действие *in vitro*, нефропротекторную активность на животных проявили торасемид, индапамид, а также малат и сукцинат натрия, метаболический корректор и антигипоксант прямого типа действия, не требующий переносчика в митохондрии – фумарат натрия. Нефропротекторное действие 15% фумарата натрия также подтверждалось на модели аноксической альтерации почек кроликов при 30-ти и 60-ти минутной тепловой ишемии почки. Отличительной особенностью 15% фумарата натрия является высокая концентрация лекарственной формы, в отличие от сукцинатсодержащих и малатсодержащих препаратов, которая позволяет создавать нефропротекторные концентрации препарата при минимальном влиянии на объем циркулирующей крови, что особенно необходимо в терапии ренального ОПП.

Нефропротекторные свойства малата и сукцината были описаны в научной литературе, лекарственные формы этих субстратов цикла Кребса предназначены главным образом для инфузионного капельного введения и имеют существенный потенциал для терапии преренального ОПП под контролем баланса жидкостной среды. При существенной доказанной многолетним опытом эффективности этих лекарственных средств для восстановления

гемодинамики следует отметить вероятность угрозы перегрузки ОЦК, ускорения перехода преренального в ренальное ОПП.

Гидрокарбонат натрия (внутривенное и пероральное введение) включён в стандарт лечения радиационным центром экстренной помощи REAC/TS США в качестве антидота при отравлении ураном. Нами установлено, что введение гидрокарбоната натрия в состав диализирующего раствора привело к увеличению скорости перитонеального клиренса урана по сравнению со стандартным раствором без натрия гидрокарбоната. Результаты теста Мантела-Кокса показали, что перитонеальный диализ с добавлением гидрокарбоната натрия способствовал достоверному увеличению постдиализной выживаемости крыс по сравнению с группой негативного контроля и диализом стандартным раствором дианилом.

Острое отравление крыс этиленгликолем приводило к развитию токсической энцефалопатии и нефропатии, метаболического ацидоза с высокой анионной разницей, обусловленной наличием метаболитов, а также лактат-кетоацидоза вследствие торможения функций центральной нервной системы. Экспериментальная терапия этанолом в сочетании с гидрокарбонатом натрия (стандартная антидотная терапия) ограничивала ацидотический сдвиг рН крови, лактат-ацидоз и кетоацидоз, повышение уровня мочевины, но существенно не влияла на уровень гидрокарбонатов, креатинина и его клиренс, анионную разницу. При введении диметилксобутилфосфонилдиметилата в условиях нашего эксперимента в дозе 150 мг/кг три раза (450 мг/кг в сутки) в течение первых суток при остром отравлении ЭГ происходило статистически достоверное снижение величин AG и Δ AG ($p = 0,042$), при этом удалось предотвратить раннее снижение клиренса креатинина и развитие гиперазотемии – маркеров скорости клубочковой фильтрации и активации обратной тубулогломерулярной связи, замедлить развитие лактат- и кетоацидоза. Выявленные эффекты превосходили таковые стандартной антидотной терапии отравлений гликолями этанолом и натрия гидрокарбонатом, что открывает перспективу для применения диметилксобутилфосфонилдиметилата в лечении отравлений ядами, вызывающих метаболический ацидоз с высокой анионной разницей. С целью предупреждения нефротоксического действия в раннюю токсикогенную фазу отравлений этиленгликолем, вызывающего метаболический ацидоз с высокой анионной разницей, введение диметилксобутилфосфонилдиметилата повышало сниженное значение рН, увеличивало количество бикарбонатов крови, предотвращало снижение клиренса креатинина.

Подобные экзогенные отравления с развитием метаболического ацидоза с высоким уровнем неизмеряемых анионов развиваются в результате передозировки ибупрофеном, отравлении метанолом, уксусной кислотой, гербицидами из группы феноксикислот. Нами теоретически обоснован патогенетический подход использования диметилксобутилфосфонилдиметилата для коррекции нарушений КОС и нефропротекции

схожего по патогенезу варианта токсической нефропатии при остром отравлении этиленгликолем.

Растительные препараты ограничивали развитие последствий цисплатиновой нефропатии – выделения с мочой профиброгенного цитокина MCP-1 и роста волокон соединительной ткани в почках, т.е. маркеров перехода ОПП в ХБП. Применение нефропротекторов на основе артишока (хофитол), золотарника (ГКЭ, нефрозолит) и комбинированного препарата канефрон Н продемонстрировало высокую эффективность на ранних этапах развития хронического нефрофиброза, корректировало мочевой синдром. Эти средства вне фазы острого повреждения и в период восстановления могут оказать существенное клиническое действие, однако их назначение может быть обосновано результатами клинических исследований эффективности и безопасности у пациентов с токсическими нефропатиями, но проведение таких исследований ограничено этическими аспектами набора в исследуемые группы. Согласно клиническим рекомендациям по острому повреждению почек и тубулоинтерстициальным болезням почек выбор терапии возложен на врача нефролога при консультировании со специалистами смежных специальностей (токсикологами).

Из изложенного следует, что новыми патогенетически обоснованными подходами к терапии токсических нефропатий являются:

1. применение в составе раствора для перитонеального диализа антидота гидрокарбоната натрия для повышения перитонеального клиренса изотопа [^{238}U] в виде его сверхпрочного по константе диссоциации гидрокарбонатного комплекса;
2. введения в токсикогенную фазу отравления этиленгликолем диметилксобутилфосфонилдиметилата для коррекции метаболического ацидоза с высокой анионной разницей и ограничения поражения почек;
3. введения конфумина в качестве нефропротектора при ишемическом и нефротоксическом ОПП;
4. применения растительных препаратов с нефропротекторными свойствами для ограничения тубулоинтерстициального нефрофиброза при токсических нефропатиях.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биологическая значимость токсических поражений почек существенна, так как этот парный, критически важный для жизнедеятельности орган связан с сердечнососудистой, иммунной и гепатобилиарной системами, поражается диффузно, а ОПП имеет многофазное течение, на ранней стадии – субклиническое, с последующей утратой функций, эффективной или «неудачной» регенерацией [94, 104, 115, 133, 191, 201, 206, 216, 247-249, 316, 384]. Формализация в виде математического преобразования данных об измерении биомаркеров нефротоксичности способна отразить основное направление развития процесса ОПП.

В качестве наиболее значимых для диагностики токсической нефропатии были отобраны следующие биомаркеры: белковые фракции и соотношение белок/креатинин мочи [1, 76, 120, 148, 156, 263, 484, 507, 556], молекула-1 повреждения почек [125, 167, 238, 252, 283, 367, 381, 392, 486, 528, 536, 550, 567, 568, 589, 599, 615], липокалин-2 [83, 204, 238, 252, 255, 269, 284, 319, 320, 392, 599], тканевой полипептидный антиген – фрагменты цитокератинов 8,18 и 19 [198, 199, 207, 223, 425], ретинол-связывающий белок [93, 416, 446], моноцитарный хемотаксический белок [434, 528, 609], трансформирующий ростовой фактор [5, 249, 286, 355, 361, 412, 490, 575], а также концентрационная функция [51, 66, 108, 118, 127, 155, 275, 327, 400, 419, 440] и изменения активности ферментов гамма-глутамилтрансферазы и лактатдегидрогеназы, показателей общего анализа мочи [4, 27, 79, 93, 138, 183, 416, 539]. Для качественного определения типа протеинурии наиболее подходящим методом является электрофоретическое разделение белков [65, 76, 96, 110, 120, 148, 220, 221, 416, 604] с последующей их MALDI-TOF/TOF идентификацией.

Нами было установлено, что при воздействии нефротоксинов формировался дефицит макроэрга АТФ, который обуславливал потерю функций почек и гибель клеток, главным образом, канальцевого аппарата. В раннем периоде отравления первичные нарушения были выявлены в отношении концентрационной функции и сопровождались гипо- и изостенурией, относительной полиурией, потерей натрия, ингибированием процессов реабсорбции воды, нарушениями энергозатратных транспортных систем канальцев. То есть, воздействие нефротоксинами на почки имело общие патобиохимические черты альтерации клеток.

Из результатов протеомного анализа ткани почек, проведённого методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием группой исследователей из Института пищевых продуктов и нутрицевтики Шанхая (Пую Ян и соавт., 2020), было установлено, что эфиры 3-монохлорпропиленгликоля вызывают нефротоксическое повреждение почек через три основные пути, включая транспорт ионов, апоптоз и метаболизм ксенобиотиков [604]. Реабсорбция попавших в первичную мочу белков

путём эндоцитоза является основной функцией ПК и нарушение этого процесса является отличительной чертой многих форм нефропатий, в том числе токсического генеза [479]. При поиске новых маркеров повреждения почек в наших исследованиях было установлено, что метод электрофоретического разделения белков мочи в сочетании с MALDI-TOF/TOF является чувствительным инструментом токсикологического протеомного метода изучения нефротоксичности. Данный метод выявлял изменения в белковом спектре протеома мочи в микрограммовом диапазоне как «зеркала» изменений со стороны повреждённых клеток канальцев нефронов (низкомолекулярные белки) и сосудов почек (альбумин и крупномолекулярные белки). В качестве ограничения по данным настоящей диссертационной работы такой подход имел вариабельную точность из-за различий в величинах коэффициентов вариации внутри зон в зависимости от величины самой протеинурии и молекулярной массы белков, что может быть предотвращено тщательным контролем дозирования образцов, подбором градиента концентрации полиакриламидного геля, большим числом повторных измерений или анализируемых зон и использованием маркеров молекулярных масс.

Впервые для разных нефротоксинов нами были установлены различия в величинах пороговых уровней, чувствительности и специфичности, изученных биомаркеров токсической нефропатии – u-KIM-1, u-RBP4, u-MCP-1 и сывороточного креатинина (маркера клубочковой фильтрации). В анализ включали биомаркеры после их нормализации к уровню креатинина мочи согласно принятым рекомендациям [283, 284, 426, 556]. Анализ результатов показал высокую степень дисперсии биологического ответа на введение в организм токсических доз нефротоксинов разной химической природы для одних (креатинин, Kim-1) биомаркеров, различия в пороговых величинах на различные сроки регистрации для ряда других биомаркеров.

Наши результаты согласовывались с данными немецких специалистов компании Merck (Дармштадт) [228, 229]. Так, анализ чувствительности определения общего белка мочи в лаборатории Т. Фукса показал, что общий белок служит маркером обнаружения повреждения проксимальных канальцев в большей степени, чем гломерулярных изменений, в то время как бета-2-микроглобулин и цистатин С больше зависели от перегрузки клубочковыми белками, чем от снижения реабсорбционной способности. Значительное увеличение содержания α -GST (альфа-глутатион-S-трансфераза) в моче наблюдалось у животных с выраженными морфологическими изменениями в печени. Следовательно, специфичность α -GST была ограничена тем фактом, что повреждение ткани печени также потенциально приводит к повышению уровня сначала в сыворотке, и впоследствии может влиять на концентрацию данного биомаркера в моче крыс. Поэтому α -GST в моче не может быть включена в перечень маркеров нефротоксичности в качестве специфического маркера для обнаружения гломерулярного повреждения [229]. В нашем исследовании данный фермент не изучался.

Увеличение уровня Kim-1 в моче, обнаруженное при токсической нефропатии с помощью анализа WideScreen, было примерно в пять раз выше, в группах, получавших цисплатин, и в 30 раз выше, чем в группах, получавших пуромицин. Анализ с помощью полоски RENA не обнаруживал низкие уровни Kim-1 в моче у животных, получавших цисплатин и пуромицин. Эти различия были более очевидны при сравнении кратности изменения уровня Kim-1 в моче для обеих технологий (WideScreen и RENA-strip) при анализе с помощью линейной регрессии и метода Бленда-Альтмана. Систематическая ошибка в уровнях экспрессии Kim-1 в моче являлась индикатором того, что определение общего и методологически независимого порога cut-off для этого биомаркера невозможно [229]. Авторами было высказано мнение, что важно тестировать образцы на различных аналитических тест-системах независимо от лежащих в их основе технологий, поскольку они позволяют надёжно контролировать уровни биомаркеров-аналитов [228, 229]. В исследовании Т. Фукса и коллег чувствительность маркеров сильно различались. Для изучения любого потенциального влияния используемой технологии при дальнейших исследованиях, необходимо использовать больше перекрывающихся панелей биомаркеров на разных платформах, а диагностическая точность биомаркеров зависит от качества используемого метода анализа и типа используемых адсорбированных антител [229].

Критерием оценки нефротоксичности может быть выход значений показателей мочи и крови за пределы бисигмального диапазона динамической нормы, помимо достоверных отличий от соответствующего контроля [10, 11, 65, 93, 416]. При таком варианте анализа пороговый уровень показателя cut-off может быть установлен как минимум или максимум в виде Mean – 2SD или Mean + 2SD у контрольной группы без воздействия в зависимости от того снижается или увеличивается измеряемый показатель в пределах 95% доверительного интервала. Однако данный подход не позволяет, кроме пороговых величин, оценить чувствительность или специфичность изменения показателя и его прогностическую ценность, не может предположить амплитуду изменения показателя при токсических воздействиях, отличных от нормального состояния организма.

Применение в качестве алгоритма диагностики токсических нефропатий ROC-анализа продемонстрировало самые точные оценки. ROC-анализ, также как и пределы бисигмального диапазона динамической нормы, вычисляет пороговые значения cut-off, но на основании сравнения групп без и с воздействием. При этом анализ бинарной классификации устанавливает чувствительность и специфичность, а также коэффициент правдоподобия положительного результата, что даёт важное преимущество такого подхода к анализу экспериментальных данных, т.е. делает его более точным. Критерием для определения порога отсечения cut-off выступало требование максимальной суммарной специфичности и чувствительности/чувствительности выше 75% или максимально достижимой (индекс Юдена).

Для анализа изменений маркеров в динамике в ряде случаев необходим нулевой день или фоновые (ретроспективные, видовые) значения [87, 93]. В качестве инструментов визуализации изменения переменных (биомаркеров) возможны следующие методики: расчёт точки снижения/увеличения на 50%, процент изменения уровня за период 1-3-7 сут, изменение наклона кривой от точки к точке, площадь под кривой между двумя точками (сроками регистрации) [87, 253].

Вторым альтернативным методом решения задачи прогноза результата выступал регрессионный анализ, однако его специфичность варьировала в зависимости от вида нефротоксина. Было установлено, что при значимой регрессии не был значим какой-либо рассматриваемый биомаркер. В качестве подхода к анализу изменения переменных возможно отдельно провести регрессию по каждому биомаркеру, выбрать значимые, соединить. Для этого необходимо проверить все данные на выбросы и мультиколлинеарность, отбросить коррелирующие переменные. Необходимо оценить значимость регрессии и установить сохраняет ли биомаркер свою предсказательную способность [235, 241, 253]. Однако, следует отметить ограничение уравнений регрессии, обусловленное сменой фаз токсической нефропатии или синхронного течения процессов первичной и вторичной альтерации клеток и начала регенерации во времени, то есть динамикой патологического процесса.

Для поиска биологического значения изменения уровня отдельных биомаркеров нефротоксичности в нашей работе проводился анализ корреляционных связей между величинами переменных – уровнями нормализованных к креатинину мочи показателей и суммой баллов по шкале «EGTI» патоморфологических изменений почечной ткани. Нефротоксины, как известно, вмешиваются в генетически детерминированный морфогенез канальцевой системы [260, 316, 384, 441, 479, 489, 545, 553, 602, 605, 617]. Корреляционный анализ Пирсона, проведённый нами, выявил статистически значимую положительную связь между показателями осмоляльности мочи и высотой нефротелия канальцев почек, $r = 0,843$ (95% ДИ 0,666–0,930), $p < 0,0001$, которая согласовывалась с описываемой в литературе связью [209, 384]. В раннем периоде, когда повреждения клеток почечных канальцев происходили на геномном и молекулярном уровнях, значимых корреляций с светооптически установленными морфологическими признаками токсической нефропатии не было установлено. Отчасти это было обусловлено отставанием во времени развития явных морфологических изменений [127, 489, 512, 540].

Экспрессия растворимых фрагментов цитокератинов СК8 и СК18 резко усиливается при пролиферации эпителиальных клеток мочевого пузыря с высокой специфичностью для диагностики рака мочевого пузыря на стадиях T1 и T2 более 80% [207] и может быть использована для мониторинга терапии цисплатином эпителиальноклеточного рака [223]. В тоже

время усиление экспрессии некоторых типов спаренных кератинов свойственно повреждению нормальных клеток почечных канальцев [199]. В настоящей работе мы исследовали другой маркер – ко-экспрессируемые фрагменты цитокератинов 8,18 и 19 с доказанной связью с апоптозом и дедифференцировкой эпителиальных тканей. Известно, что в условиях острого повреждения почек апоптоз и некроз могут возникать одновременно, а преобладание апоптотической гибели клеток по сравнению с некротической может существенно различаться в экспериментальных условиях у разных видов, что связано с особенностями митохондриальной проницаемости, активации классических апоптотических стимулов и регуляции клеточных уровней АТФ [96, 115, 119, 191, 194, 198, 225]. Также при проведении биопсии после трансплантации или посмертного гистологического анализа у пациентов с ОПН было продемонстрировано наличие как некротических, так и апоптотических клеток проксимальных канальцев нефронов [18, 59, 64, 78, 225, 340, 377, 396, 443]. Термин некраптоз предполагает, что и апоптоз, и некроз могут быть вызваны общими причинами, но достигают максимума при некрозе, либо при запрограммированном самоуничтожении – апоптозе. При апоптотической гибели клеток, если повреждение является летальным и происходит истощение АТФ, вмешивается вторичная некротическая смерть. При воздействии многих нефротоксинов (цисплатин, гентамицин, ртуть, хром) признаки некроза проявлялись через 3 суток, в то же время признаки сублетального повреждения и апоптоза – в более ранний момент времени, что позволяет предположить, что большая часть наблюдаемого некроза является вторичной [225, 340, 377, 403, 443], а биомаркеры апоптоза могут быть ранними свидетелями химической травмы [198, 228, 229, 237, 425]. Некроз и его модальности [115, 119, 191, 277, 582] более выражен во внешнем мозговом веществе, где снижение парциального давления кислорода усугубляется сужением сосудов [214], увеличивающего степень истощения АТФ в этой области по сравнению с корковой зоной. Поиск взаимосвязи между уровнями маркеров в моче и величиной апоптотической гибели нефротелиоцитов в настоящей работе установил пару «тканевой полипептидный антиген (u-ТРА, фрагменты цитокератинов 8,18 и 19) – апоптоз», а с уровнем некротической гибели – пару «молекула-1 повреждения почки (Kim-1) – некроз». Таким образом, между увеличением уровня u-ТРА в моче, апоптозом и дефицитом макроэрга АТФ в клетках почечных канальцев с большой долей вероятности существует связь, выявляемая при действии нефротоксинов на почки.

В диссертационной работе рассматривались три временные точки с целью выбора оптимального времени для диагностирования токсической нефропатии [225, 238, 531, 550, 589, 608], используя подходы для оценки эффективности химиотерапии заболеваний у человека [87].

Дизайн эксперимента был выстроен следующим образом: контрольная группа была представлена животными, которым вводили плацебо (фармакологически и токсически

индифферентный растворитель), а в опытной группе животным вводили токсическую дозу нефротоксина; на 1-3-7 сутки животных помещали в обменные клетки для сбора мочи, после чего отбирали образцы крови и проводили плановую эвтаназию с вскрытием и гистопатологическим исследованием почек. Такое разделение животных было обусловлено поиском корреляционных связей между показателями в моче и величиной патоморфологических изменений в каждой временной интервал. Принимая во внимание естественную отсроченную диагностическую способность сывороточного креатинина («золотого» стандарта диагностики нефропатологии по снижению скорости клубочковой фильтрации) и то, что ОПП возникает в результате острого канальцевого некроза как главного типового варианта токсической нефропатии, другой вид положительного биомаркера нефропатии токсического генеза может выявить субклиническое ОПП, которое определяется без неизбежного или последующего, определяющего ОПП, повышения сывороточного креатинина. На основании проведённого анализа было выявлено, что на 1 сутки статистически значимые изменения наблюдаются только для показателей u-TPA и u-NGAL, на 3 сутки уже отмечаются статистически значимые изменения во всех показателях, на 7 сутки показатели имеют разнонаправленные изменения уровней, отражая фазы течения ОПП. Следовательно, для рассмотрения алгоритма ранней диагностики оптимально выбрать период 1-3 сутки. Для определения методики классификации образцов на «здоровых» и «больных» применялся ROC-анализ с определением пороговых концентраций с оптимальным сочетанием чувствительности и специфичности, что позволяет выявлять риск последующего функционального ОПП. Положительные результаты тестов на биомаркеры прогностически информативны независимо от того, снижается функция почек или нет. Установленные значимые корреляции между маркерами позволяли исключить один из коррелирующих показателей, в случае отдельного инвазивного сложного или дорогостоящего анализа. Таким образом, в качестве методики определения наличия «заболевания» для ранней диагностики нефропатий токсического генеза предлагается использовать полученные дискриминационные уровни показателей на 1-3 сутки, а образцы считать «больными» при превышении дискриминационного уровня cut-off до начала подъёма уровня креатинина крови. Отобранные биомаркеры, проявившие максимальную чувствительность и специфичность, могут быть использованы при создании мультимаркерных диагностических панелей (мультиплексных тест-систем).

Так, известно, что у животных, получавших ванкомицин, наблюдалось значительное увеличение классических маркеров мочевины и креатинина в сыворотке крови [248, 249, 462]. При этом в эти же сроки роста азотемии продемонстрировать более высокую чувствительность и специфичность биомаркеров-белков в моче было невозможно. В связи с этим клиническая значимость изменения уровня креатинина и мочевины в период их существенного увеличения

выступает на передний план с позиций как с экономической, так и клинической целесообразности [423, 460, 494, 540].

Ошибочная диагностическая классификация может быть связана как с перекрывающимся распределением значений биомаркеров у «больных» и «здоровых», так и с коэффициентом вариации (CV) измерений, который не должен превышать 20%. Сравнение величин CV10% для двух классических маркеров креатинина и мочевины, а также двух биомаркеров в моче – липокалина-2 (u-NGAL) и молекулы-1 повреждения почки (u-Kim-1) при проведении оценки внутрисерийной и межсерийной воспроизводимости в данной диссертационной работе внутри одной исследовательской лаборатории представлены в таблицах 39 и 40.

Таблица 39 – Внутрिलाбораторная воспроизводимость измерений двух биомаркеров в крови

№ пп/Параметр	Внутрисерийная воспроизводимость		Межсерийная воспроизводимость	
	мочевина, ммоль/л	креатинин, мкмоль/л	мочевина, ммоль/л	креатинин, мкмоль/л
1	5,8	67,1	5,3	65,3
2	5,9	69,3	4,9	70,0
3	5,5	67,0	5,6	62,0
4	5,6	67,9	5,2	64,5
5	5,6	68,1	5,6	69,1
6	5,5	67,8	5,4	64,6
7	5,6	65,3	5,5	70,5
8	5,6	67,1	4,8	67,9
9	5,8	67,4	5,2	65,1
10	5,8	68,0	5,9	67,0
Mean	5,7	67,5	5,3	66,6
SD	0,1	1,0	0,3	2,8
CV10 % фактич.	2,4	1,5	6,3	4,1
CV паспорт %	2,5	2,5	6,5	5,5
X-2SD	5,4	65,4	4,7	61,1
X+2SD	5,9	69,6	6,0	72,1

Примечание: Mean, X – среднее значение измерения; SD – стандартное отклонение; CV – коэффициент вариации

Количественная оценка почечного функционального резерва необходима для выявления субклинического повреждения и оценки восстановления функций почек [523], подбора потенциальных доноров для трансплантации почки [576]. Активация тубулогломерулярной обратной связи [115, 173] лучше всего объясняет снижение скорости клубочковой фильтрации при нефротоксическом повреждении канальцев и определяет время начала ЗПТ [217]. Сохраняющаяся реабсорбция в наружном мозговом веществе усиливает провоспалительные эффекты, вызванные гипоксией, которые ухудшают восстановление клеток. Ингибирование этого транспорта в толстом восходящем колоне петель Генле ограничивает повреждение

канальцев. Таким образом разгрузка почек путём проведения заместительной почечной терапии может существенно улучшить выживаемость и уменьшить необратимую потерю функции почек при ОПП [6, 24, 28, 32, 33, 63, 71, 72, 562].

Таблица 40 – Внутрिलाбораторная воспроизводимость измерений двух биомаркеров в моче

№ пп/Параметр	Внутрисерийная воспроизводимость		Межсерийная воспроизводимость	
	u-Kim-1, нг/мл	u-NGAL, нг/мл	u-Kim-1, нг/мл	u-NGAL, нг/мл
1	0,255	486,900	0,245	386,900
2	0,251	433,900	0,241	433,900
3	0,229	426,700	0,271	426,700
4	0,286	447,400	0,283	397,400
5	0,256	496,900	0,246	496,900
6	0,254	460,600	0,254	380,600
7	0,251	426,700	0,158	426,700
8	0,238	447,500	0,293	397,500
9	0,247	496,800	0,247	496,800
10	0,286	435,000	0,176	456,000
Mean	0,255	455,840	0,241	429,940
SD	0,018	28,100	0,043	42,250
CV10 % фактич.	7,130	6,160	17,860	9,830
CV паспорт %	15,000	6,500	20,000	11,500
X-2SD	0,219	399,600	0,155	345,400
X+2SD	0,292	512,000	0,328	514,400

Примечание: Mean, X – среднее значение измерения; SD – стандартное отклонение; CV – коэффициент вариации

Хелатотерапия для лечения системной интоксикации ураном является ведущим методом терапии при отравлениях [533]. Подобный этому подход, ранее не изученный, был реализован в нашем исследовании при комбинировании применения гидрокарбоната натрия – антидота урана [453, 608] в составе раствора для острого перитонеального диализа у крыс. Сравнение изучаемых растворов А и Б для диализа показало, что величины показателей находились в приемлемом диапазоне физико-химических параметров. Анализ эффективности удаления изотопа урана [^{238}U] из организма за 6 сеансов перитонеального диализа к 48 часам после отравления показал, что включение в состав раствора Б гидрокарбоната натрия приводит к увеличению скорости выведения токсичного элемента по сравнению с раствором А за счёт связывания в более прочный гидрокарбонатный комплекс урана. Такая интракорпоральная терапия не ухудшала мониторируемые параметры ультрафильтрации и доли снижения уровня мочевины (URR%), увеличивала постдиализную выживаемость крыс. Эти результаты впервые показали, что добавление антидота в раствор для перитонеального диализа является эффективным методом

заместительной почечной терапии, которое способствует сохранению эффективной паренхимы почек крыс, отравленных нефротоксичным соединением урана.

Фармакотерапия токсической нефропатии, вызванной острым отравлением этиленгликолем, включала в себя применение мембраностабилизирующего антиоксиданта и корректора нарушений кислотно-основного баланса диметилксобутилфосфонилдиметилата (димефосфона). Отравление этиленгликолем крыс сопровождалось развитием смешанного варианта метаболического ацидоза с высокой анионной разницей AG больше 30 ммоль/л. Анализ расчётных параметров КОС в крови продемонстрировал, с одной стороны по критерию $\Delta AG/\Delta HCO_3 > 2$, сочетание метаболического и респираторного ацидоза как следствия нейротоксического действия этиленгликоля и рабдомиолиза [179], а с другой – по величине $\Delta Gap > 6$ ммоль/л, наличие смешанного метаболического ацидоза-алкалоза, характерных для экзогенных отравлений. Сравнение стандартной антидотной терапии этанолом в сочетании с гидрокарбонатом натрия с терапией димефосфоном показало преимущества последней за счёт предотвращения снижения клиренса креатинина и уровня бикарбонатов в крови, ограничения увеличения активности лактатдегидрогеназы, статистически достоверного действия в отношении анионной разницы и ΔAG . Сравнительный анализ двух методов коррекции ацидоза у крыс при остром отравлении ЭГ показал, что димефосфон оказывает более выраженное действие в отношении маркеров метаболического ацидоза (анионной разницы и её производных расчётных величин) и ограничивал осмотический некроз нефротелиоцитов. Данные, полученные в нашей работе, подтверждают, что терапия острого отравления ЭГ димефосфоном, имеет ряд значительных преимуществ, так как обеспечивает коррекцию метаболического ацидоза с высокой анионной разницей и токсической нефропатии, расширяя возможности стандартной антидотной терапии.

Вазодилатирующие свойства диметилксобутилфосфонилдиметилата обусловлены влиянием на эндотелий микрососудов, повышением синтеза эндогенного оксида азота и проявлением вазодилатирующего действия вследствие предупреждения высвобождения норадреналина и блокированием реакции сосудов на адренергическую активацию. Димефосфон усиливает синтез цитохромов c, c1, a, a3 в митохондриях и активирует внешний путь свободного окисления НАДН в гепатоцитах [17, 45]. Мембраностабилизирующий эффект диметилксобутилфосфонилдиметилата обусловлен Ca^{2+} -зависимой вазодилатацией и сопровождается снижением уровня внутриклеточного кальция [45]. Эти эффекты, наряду с уменьшением потребления энергии и коррекцией метаболического ацидоза с высокой анионной разницей, указывают на возможный механизм нефропротекторного действия препарата при токсической нефропатии при отравлении этиленгликолем.

Необходимо отметить ряд различий в действии изученных препаратов на клеточных линиях и у животных. Тестирование ряда веществ и лекарственных препаратов показало разнонаправленное их действие, в ряде случаев зависящее от концентрации. Так, из веществ, оказавших цитопротекторное действие *in vitro*, нефропротекторную активность *in vivo* проявили петлевые диуретики торасемид и индапамид – ингибиторы активного транспорта в почечных канальцах, а также метаболический корректор, влияющий на энергетические процессы в клетках путём субстратного обращения цикла трикарбоновых кислот и антигипоксанта прямого действия, не требующий переносчика в митохондрии, фумарат натрия. Вазотропные препараты триметазидин и сулодексид, применяемые в клинической практике, не проявили прямого цитопротекторного действия на клетки почечного эпителия, что объясняет их опосредованные нефропротекторные эффекты через сосудистое микроокружение и метаболические реакции.

Растительные препараты обладали нефропротекторными свойствами, которые развивались при курсовом введении и выражались в ограничении выделения с мочой фактора инфильтрации ткани почек моноцитами MCP-1 и нефрофиброза из-за ингибирования роста коллагеновых волокон внеклеточного соединительнотканного матрикса как последствия токсической нефропатии. Наибольший эффект отмечали при фармакотерапии фитопрепаратами, содержащими экстракт золотарника – нефрозолит и гранулят композиции экстрактов.

Было установлено что в рубрикаторе клинических рекомендаций Министерства здравоохранения Российской Федерации отсутствуют утверждённые указания по ведению пациентов с нефропатиями токсического генеза. Вся информация о проведении диагностики и терапии представлена в клинических рекомендациях по острому повреждению почек и тубулоинтерстициальным заболеваниям почек, которые подлежат обязательному пересмотру каждые 3 года [32, 33]. Доказана перспективность включения в патогенетическую терапию токсических нефропатий средств нефропротекторного (конфумин) и антиацидотического действия (диметилноксобутилфосфонилдиметилат), антидота для применения в составе заместительной почечной терапии с целью ускорения элиминации нефротоксина из организма (гидрокарбонат натрия), а также ряда растительных нефропротекторов (нефрозолит, экстракты из трав *Solidago sp.*, *Agrimonia sp.* и *Bidens sp.* и других). Все вышеперечисленные направления фармакотерапии токсических нефропатий необходимо учитывать при поиске и разработке новых методов нефропротекции и расширения (репозологии) известных и применяемых лекарственных препаратов в клинической практике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги работы. В настоящем исследовании разработаны теоретические и практические положения, совокупность которых будет способствовать оптимизации диагностики и лечения токсических нефропатий. Для достижения этих целей были использованы следующие подходы: (1) моделирование нефропатий токсического генеза ядами и лекарственными препаратами с применением клинико-биохимических, токсикологических, патоморфологических, биоинформатических и статистических методов и оценок получения доказательств развития повреждения нефронов и (2) разработка методов антидотной и детоксицирующей терапии токсических нефропатий с коррекцией метаболического ацидоза с высокой анионной разницей, применением перитонеального диализа, нефропротекторов.

При решении поставленных в настоящем диссертационном исследовании задач был получен ряд научных данных фундаментального характера. Нефротоксический процесс является хемогенным патологическим состоянием, которое свидетельствует о повреждении жизненно важных органов мочевыделительной системы – почек и истощении их клеточных гомеостатических механизмов.

При изучении кинетики токсического эффекта было установлено, что в раннем периоде острого повреждения почек токсического генеза «свидетелями» выступают: с высокой диагностической ценностью тканевой полипептидный антиген и липокалин-2, достоверно увеличивающиеся в моче и выходящие за пределы дискриминационного уровня cut-off. Установлена положительная корреляция между уровнями фрагментов цитокератина 8/18,19 и Kim-1 в моче с долей клеток почек, погибающих по механизму апоптоза и некроза. Превышение дискриминационного уровня биомаркеров u-TPA, u-NGAL, u-KIM-1, u-RBP4, u-MCP-1, u-TGF- β 1 свидетельствует о развитии токсической нефропатии.

При воздействии большого числа нефротоксинов прямого типа действия выявлено снижение концентрационной функции почек вследствие нарушения работы транспортных систем нефронов, а также ряд других патологических изменений, выявляемых лабораторными методами, утрата щелочной каймы, конденсация хроматина и дистрофические изменения клеток проксимальных канальцев.

Восстановление повреждённой ткани почек, вследствие дисбаланса профиброгенных цитокинов MCP-1 и TGF- β 1, превалирования тубулоинтерстициальных изменений и васкулопатии, может происходить путём цитокин-модулируемого эпителиально-мезенхимального перехода 2 типа. При этом в почках накапливаются и не деградируют компоненты внеклеточного матрикса – кислые гликозаминогликаны и коллаген, мониторинг

которых в моче и ткани почек даёт информацию о степени несовершенного восстановления – нефрофиброза, что может быть использовано в качестве мониторируемых биомаркеров для оценки эффективности нефропротекторной терапии.

Научно апробированы новые патогенетически обоснованные подходы к фармакотерапии токсических нефропатий: включение антидота урана гидрокарбоната натрия в состав раствора для перитонеального диализа, увеличивающее перитонеальный клиренс изотопа [^{238}U] и выживаемость животных; расширение возможностей стандартной антидотной терапии отравлений этиленгликолем с помощью диметилкосбутилфосфонилдиметилата, оказывающего действие на метаболический ацидоз с высокой анионной разницей, предотвращающего снижение клиренса эндогенного креатинина и уменьшающего степень осмотического некроза нефротелиоцитов; введение 15% раствора фумарата натрия для предотвращения нефротоксического и ишемического острого повреждения почек; применение растительных нефропротекторов хофитола, нефрозалида, канефрона Н и композиции экстрактов золотарника, репешка и череды для ограничения воспаления и тубулоинтерстициального нефрофиброза токсического генеза.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Разработанные в настоящем исследовании методические приёмы диагностики и экспериментальной терапии нефропатий токсического генеза могут быть использованы для дальнейшего изучения патогенеза токсических нефропатий, механизмов нефротоксичности новых химических веществ, лекарственных препаратов и их сочетаний в рамках изучения взаимодействия (в т.ч. полипрагмазии), метаболизма и фармакокинетики, а также механизмов нефропротекции в условиях *in vivo*, которые лишены ограничений для методов *in vitro* и максимально приближаются к клиническим.

Планируется проведение сравнительных исследований с более детальным изучением механизмов повреждения для расширения знаний о фенотипах острого повреждения почек на основе патофизиологии и уточнения понимания лежащей в их основе биологической последовательности и кинетики токсических эффектов. Для достижения цели ранней диагностики нефропатий токсического генеза необходим поиск чувствительных биомаркеров повреждения нефротелиоцитов. В перспективе целесообразно расширить фундаментальные основы антидотной и патогенетической терапии и методов заместительной почечной терапии с целью поиска новых лекарственных средств и антидотов в составе диализирующих растворов.

Успешная апробация представленных в диссертационном исследовании новых подходов к диагностике и экспериментальной терапии нефропатий токсического генеза открывает перспективу клинической верификации разработанных инноваций в диагностике и лечении указанных патологических состояний.

ВЫВОДЫ

1. Поиск биомаркеров в протеомном профиле мочи с помощью электрофоретического разделения и тандемной времяпролетной MALDI-масс-спектрометрии, проведение иммуноферментного анализа в одноплексных системах, анализ вероятности правильного прогноза при наблюдении тестовой переменной дискриминационного уровня cut-off биомаркеров в различные сроки после воздействия и оценка качества бинарных классификаций являются перспективным подходом для изучения патогенеза токсических нефропатий и выбора маркеров для создания мультиплексных диагностических тест-систем.

2. Свидетелями процессов апоптоза, дедифференцировки, дистрофических изменений и некроза нефротелиоцитов, нарушения реабсорбции белков первичной мочи, моноцитарно-макрофагальной инфильтрации и регенерации нефронов являются тканевой полипептидный антиген, липокалин-2, молекула-1 повреждения почки, ретинол-связывающий белок, моноцитарный хемотаксический белок-1, трансформирующий ростовой фактор бета-1, соответственно.

3. Биомаркеры эффекта в моче, нормализованные к уровню креатинина и оценённые в динамике на 1, 3 и 7 сутки, при превышении дискриминационного уровня cut-off, установленного при максимальной чувствительности и специфичности, свидетельствуют о развитии токсической нефропатии.

4. Выявленные согласованные изменения двух признаков между биомаркерами и суммой баллов патоморфологических изменений по шкале EGPI подтверждают эффективность применения трёхточечного кинетического метода для диагностики токсических нефропатий.

5. Функциональные изменения почек при токсических нефропатиях характеризуются нарушением акваретической и концентрационной функции, активацией тубулогломерулярной обратной связи и снижением скорости клубочковой фильтрации.

6. Токсические нефропатии характеризуются морфологическими признаками повреждения почек: синхронного течения процессов апоптоза, атрофии, дистрофии и некроза нефротелия канальцев почек; поражения тубуло-интерстициального и сосудистого компонентов нефронов на различных стадиях прогрессии.

7. Включение гидрокарбоната натрия в схеме применения при перитонеальном диализе при остром отравлении нефротоксичными соединениями урана приводит к увеличению перитонеального клиренса токсиканта на 276,2% и повышению уровня выживаемости отравленных животных.

8. Диметилсобутилфосфонилдиметилат при введении в течение первых суток острого отравления этиленгликолем ограничивает подъем пула неизмеряемых анионов крови отравленных крыс, предотвращает снижение клиренса эндогенного креатинина и уменьшает степень осмотического некроза нефротелиоцитов.

9. Фумарат натрия в виде 15% раствора оказывает нефропротекторное действие при токсическом и ишемическом остром повреждении почек, уменьшая степень повреждения нефротелиоцитов.

10. Фитопрепараты хофитол, нефрозолид, канефрон Н, гранулят композиции экстрактов из трав золотарника, репешка и череды ограничивают прогрессирование фиброза почечной ткани и снижают интенсивность воспаления и оксидативного стресса при токсических нефропатиях.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для повышения качества диагностики токсических нефропатий следует проводить исследование тубулярных белков мочи методом электрофоретического разделения в геле полиакриламида с последующей тандемной времяпролетной масс-спектрометрической идентификацией.
2. Для диагностики токсической нефропатии следует использовать кинетический подход измерения уровня биомаркеров тканевого полипептидного антигена, липокалина-2, молекулы-1 повреждения почки, ретинол-связывающего белка, моноцитарного хемотаксического белка-1 и трансформирующего ростового фактора бета-1 в моче, нормализованных к уровню креатинина. Объективным признаком развития токсической нефропатии можно считать превышение рассчитанных пороговых уровней cut-off биомаркеров, установленных при максимальной чувствительности и специфичности методом ROC-анализа.
3. Таргетная (в отношении этиологического фактора) и персонифицированная (на основе уточнённого диагноза) фармакотерапия отравлений нефротоксичными веществами может включать в себя:
 - натрия гидрокарбонат в составе раствора для перитонеального диализа в терапии отравлений ураном при мониторинге клиренса изотопа урана [^{238}U];
 - диметилксобутилфосфонилдиметилат в терапии отравлений этиленгликолем в токсикогенную фазу отравления под контролем параметров кислотно-основного состояния (анионной разницы, бикарбонатов крови) и клиренса креатинина;
 - 15% раствор фумарата натрия для профилактики и терапии ишемического и нефротоксического острого повреждения почек в качестве нефропротектора;
 - растительные нефропротекторы (хофитол, нефрозолид, канефрон Н) для ограничения перехода острого повреждения почек в хроническую болезнь почек, при этом необходимо проводить общий и биохимический анализ мочи для мониторинга их безопасности и эффективности.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДГ	–	алкогольдегидрогеназа
АлАП	–	аланинаминопептидаза
АмБ	–	амфотерицин Б
АР	–	анионная разница, AG, anion gap
АФК	–	активные формы кислорода
АТФ	–	аденозинтрифосфорная кислота
БМЧ	–	биомониторинг человека
БРА	–	блокаторы рецептора ангиотензина
ВГ	–	восстановленный глутатион, GSH
ВНиСММ	–	вещества низкой и средней молекулярной массы
ВОЗ	–	Всемирная организация здравоохранения, WHO
ВЭЖХ	–	высокоэффективная жидкостная хроматография, HPLC
ГК	–	гексокиназа
ГАГ	–	гликозаминогликаны
ГЖХ-ДЭВ	–	газожидкостная хроматография с детектором электронного захвата
Г(Ж)Х-МС	–	газовая(газожидкостная) хроматография с масс-детекцией
ГКС	–	глюкокортикостероидные средства
ГКЭ	–	гранулят композиции экстрактов
ГЛФ	–	готовая лекарственная форма
ГМК	–	гладкомышечные клетки
ГТФ	–	гамма-глутамилтрансфераза
Д	–	диурез
ДИ	–	доверительный интервал
ДК	–	дистальные каналцы
ДМФ	–	диметилксобутилфосфонилдиметилат, димефосфон
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДТТ	–	дитиотреитол
ДХЭ	–	дихлорэтан-1,2
ДЭГ	–	диэтиленгликоль
ИА	–	индекс апоптоза
иАПФ	–	ингибиторы ангиотензипревращающего фермента (iACE-2)
ИЛ	–	интерлейкин, IL

ИМП	–	инфекции мочевыводящих путей
ИФА	–	иммуноферментный анализ, ELISA
кДа	–	килодальтоны
КИ	–	концентрационный индекс (концентрация в моче/крови)
КОС	–	кислотно-основное состояние, КЩР
КОТ	–	комбинированное острое отравление
ЛАП	–	лейцинаминопептидаза
ЛДГ	–	лактатдегидрогеназа
ЛС	–	лекарственные средства
ЛРС	–	лекарственное растительное сырье
МАЛ	–	малеат натрия
МДГ	–	малатдегидрогеназа
МК	–	массовый коэффициент органа
МКБ-10	–	международная классификация болезней 10-пересмотра
МС	–	масс-спектрометрия, TOF/MS
МСМ	–	молекулы средней массы
НАГ	–	бета-N-ацетилглюкозаминидаза
НАД(Н)	–	никотинамидадениндинуклетоид
НАДФ(Н)	–	никотинамидадениндинуклетоид фосфат
НПВС	–	нестероидные противовоспалительные средства
ОКН	–	острый канальцевый некроз
ОПН	–	острая почечная недостаточность, утрата функций
ОПП	–	острое повреждение почек, АКІ – acute kidney injury
ОПечН	–	острая печеночная недостаточность
ОСВ	–	общее солевыведение
ОЦК	–	объем циркулирующей крови
ПААГ	–	полиакриламидный гель
ПД	–	перитонеальный диализ
ПК	–	проксимальные каналы
ПОЛ	–	перекисное окисление липидов
ПЦА	–	пороговая концентрация цитопротекторной активности
ПЭТ	–	позитронно-эмиссионная томография
РЗЭ	–	редкоземельные элементы
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
САТ	–	стандартная антидотная терапия

САФ (СМ)	– сульфаниламидные препараты
СКФ	– скорость клубочковой фильтрации, GFR
СТ	– собирательные трубочки
ТБК-РП	– тиобарбитурат-реактивные продукты, включая МДА – малоновый диальдегид
ТИН	– тубулоинтерстициальный нефрит (о-острый, х-хронический)
ТИП	– тепловая ишемия почки
ТИФ	– тубулоинтерстициальный нефрофиброз (х-хронический)
ТМ	– токсичные («тяжёлые») металлы
ТМБ	– тетраметилбензидин
ТСХ	– тонкослойная хроматография
УАД	– уранил ацетат дигидрат
УФ	– ультрафиолетовый диапазон света
ФГНЗ	– фосфорилированный по серину 10 гистон НЗ
ФОС	– фосфорорганические соединения
ФС	– фармацевтическая субстанция
ХБП	– хроническая болезнь почек
ХПН	– хроническая почечная недостаточность
ЦОГ	– циклооксигеназа
ЦсА	– циклоспорин А, CsA
ЩФ	– щелочная фосфатаза
ЭГ	– этиленгликоль
ЭФ-МАЛДИ	– электрофорез с матричной лазерной десорбцией и ионизацией
АА	– аристолохиевая кислота
А ₃ AR	– аденозиновый А ₃ рецептор
α1-AT	– альфа-1-антитрипсин
АВСВ6	– АТФ-связывающий кассетный транспортёр
АFOG	– краситель кислый фуксин-оранжевый Ж
Ang-II	– ангиотензин-2
АОРР	– продукты глубокого окисления белков
αSMA	– альфа-гладкомышечный актин (α-ГМА)
AUC	– площадь под кривой
β2-MG	– бета-2-микроглобулин
BrDU	– бромдезоксиуридин
CE-MS	– капиллярный электрофорез с масс-спектрометрией

CK	–	цитокератин
Cl	–	клиренс
CLU	–	кластерин
CNT	–	индекс нефротоксичности грибов рода Паутинник
CTGF	–	фактор роста соединительной ткани
Cut-off	–	дискриминационный уровень, пороговое значение, точка отсечения
CyC	–	цистатин С
CypA	–	циклофилин А
Cyp P-450	–	цитохром Р-450
CV	–	коэффициент вариации
D-3-HBA	–	3-гидроксимасляная кислота
DOR	–	отношение диагностических шансов
ΔAG	–	избыток анионной разницы
ΔGAP	–	отношение избытка анионной разницы к дефициту бикарбоната
ΔpH	–	разность величины pH с нормальными значениями
ЕС	–	электропроводность
EGF	–	эпидермальный ростовой фактор
EGTI	–	шкала состояния эндотелий-клубочки-канальцы-интерстиций
ETHE1	–	белок этилмалоновой энцефалопатии 1
FE-Na	–	фракционная экскреция натрия
FTIR	–	Fourier-transform infrared spectroscopy, ИК-Фурье-спектроскопия
GSK3β	–	гликогенсинтазы киназа 3 бета
HCCA	–	α-циано-4-гидроксикоричная кислота
HIF	–	гипоксией индуцируемый фактор
HLA	–	человеческий лейкоцитарный антиген
HO-1	–	гемоксигеназа 1
HRP	–	пероксидаза из хрена
IC ₅₀	–	средняя ингибиторная концентрация
ICP-AES	–	атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой
ICP-MS/MS	–	масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой
IgG	–	иммуноглобулины класса G
IGFBP7	–	белок 7, связывающий инсулиноподобный фактор роста
Inf	–	бесконечность
ISE	–	ионселективный электрод
KEAP1	–	Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1

Kim-1	– молекула-1 повреждения почки
Kt/V	– диализная доза
LD ₅₀₍₁₀₀₎	– летальная доза (средняя – 50%, абсолютная – 100%)
L-FABP	– L-жирных кислот связывающий белок
LLC	– культура клеток почки обезьяны
LOD	– предел обнаружения
LOQ	– предел количественного определения
LR	– коэффициент правдоподобия положительного результата
MALDI-TOF/TOF	– тандемная времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией и ионизацией
MARS	– molecular absorbent recycling system, молекулярно-адсорбентная рециркуляционная система
MASCOT	– база данных для идентификации, характеристики и количественного определения белков с использованием данных масс-спектрометрии
MC-1	– митохондриальный комплекс-1
MCP-1	– моноцитарный хемоаттрактантный белок-1, CCL2 (C-C motif ligand 2)
MDCK	– культура клеток почки Спаниеля
MS-2	– масс-спектрометрический анализ 2 (MS/MS)
Mean	– среднее (арифметическое) значение
Nec-1	– некростатин-1, ингибитор некроптоза
NF-κB-p65	– ядерный фактор каппа-B
NGAL	– липокалин-2, ассоциированный с нейтрофильной желатиназой
NPC	– клетки-предшественники нефронов
NPDS	– национальная система данных о ядах, включающая 55 центров
NPV	– отрицательная прогностическая ценность
Nrf2	– ядерный фактор транскрипции, связанный с эритроидом 2, фактор 2
NRU	– тест захвата нейтрального красного
8-OHdG	– 8-гидроксидезоксигуанозин
OAT	– транспортёр органических анионов
OCT	– транспортёр органических катионов
p	– уровень значимости
p38MAPK	– митоген-активируемые протеинкиназы p38
PAS	– окраска периодной кислотой по Шиффу
PASM	– окраска периодной кислотой по Шиффу и метенамином серебра

Pax2	– ген транскрипционного фактора с парным бокс-доменом связывания ДНК, участвующий в образовании пронефроса
P/C-Ratio	– индекс белок/креатинин мочи
PCI [²³⁸ U]	– перитонеальный клиренс изотопа урана ²³⁸ U
PDGF	– тромбоцитарный фактор роста
PFAD	– plasma filtration adsorption dialysis, плазмофильтрация с адсорбцией и диализом
pH	– водородный показатель
ppm	– концентрация частиц на миллион, мг/л
PPV	– положительная прогностическая ценность
RANTES	– хемокин, секретируемый тромбоцитами
RBP	– ретинол-связывающий белок
Rf	– относительный фронт пробега вещества на хроматограмме
RhoA	– ГТФ-аза трансформирующий белок регуляции цитоскелета
RI	– показатель преломления
RIPK	– взаимодействующая с рецептором серин/треонин-протеинкиназа
ROC	– кривая бинарной классификации чувствительности и специфичности
RTEC	– клетки почечного канальцевого эпителия (нефротелий)
sCr	– сывороточный креатинин
SD	– стандартное отклонение
SEM	– ошибка среднего значения
SG	– удельный вес, плотность
SIRT-1	– НАД-зависимая деацетилаза сиртуин-1
SM	– окраска по Штернхаймеру-Мальбину
Smad	– модуляторы сигнала для рецепторов суперсемейства трансформирующего фактора роста бета
SMX	– сульфаметоксазол
Tc H ₂ O	– величина максимальной реабсорбции осмотически свободной воды
TCR	– Т-клеточный рецептор
TDS	– общее солесодержание
TGF	– трансформирующий ростовой фактор
TIMP	– тканевой ингибитор металлопротеиназы
TNFa	– фактор некроза опухолей
TPA	– тканевой полипептидный антиген, цитокератины 8,18 и 19
TTKG	– транстубулярный калиевый градиент

URR	–	фракционное снижение мочевины во время диализа
VEGF	–	сосудисто-эндотелиальный фактор роста
$V_{ex/in}$	–	величина относительной ультрафильтрации
WT1	–	ген супрессора роста опухоли Вильмса

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализатор мочи URiСКАН-БК для определения содержания концентрации общего белка и креатинина в моче и автоматического определения соотношения белок/креатинин. ГУ 9443-006-59879815-2012. РУ № ФСР 2012/13596 от 28.06.2012. Руководство по эксплуатации, паспорт. – 35 с.
2. Афанасьев, В.В. Догоспитальная цитопротекция. Старая проблема – новые грани / В.В. Афанасьев, И.Ю. Лукьянова, С.А. Румянцева, С.А. Климанцев, В.А. Михайлович, Е.В. Силина, Т.Н. Саватеева-Любимова, А.В. Саватеев, А.В. Соколов, А.В. Афанасьев // Скорая медицинская помощь, 2009. – № 4. – С. 39 – 53.
3. Афанасьев, В.В. Роль медиаторных токсиндромов в диагностике острых отравлений лекарственными средствами на догоспитальном этапе и в приемном отделении стационара / В.В. Афанасьев // Скорая медицинская помощь, 2012. – № 2. – С. 40 – 46.
4. Батюшин, М.М. Роль анальгетиков и нестероидных противовоспалительных препаратов в развитии интерстициальных поражений почек / М.М. Батюшин, О.В. Дмитриева, В.П. Терентьев // Нефрология и диализ, 2006. – №8 (3). – С. 239 – 243.
5. Батюшин, М.М. Эпителиально-мезенхимальная трансформация как один из аспектов репарации почек в рамках хронической нефропатии / М.М. Батюшин // Нефрология, 2015. – № 5. – С. 77 – 80.
6. Батюшин, М.М. Острое почечное повреждение: современный взгляд на проблему / М.М. Батюшин, Л.И. Руденко, А.А. Кастанаян, Б.И. Воробьев // Consilium Medicum, 2016. – №18 (7). – С. 43 – 48.
7. Беляков, Н.А. Энтеросорбция / Н.А. Беляков. – Л.: Центр сорбционных технологий, 1991. – 338 с.
8. Белялов, Ф.И. Лечение внутренних болезней в условиях коморбидности: монография. Изд. 8, перераб. и доп. / Н.А. Белялов. – Иркутск: РИО ИГМАПО, 2013. – 297 с.
9. Берхин, Е.Б. Фармакология почек и ее физиологические основы / Е.Б. Берхин. – М.: Медицина, 1979. – 336 с.
10. Биомаркеры и оценка риска: концепция и принципы. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. – М.: Медицина, 1996. – 96 с.
11. Биомониторинг человека: факты и цифры. – Копенгаген: Европейское региональное бюро ВОЗ, 2015 г.– 104 с.

12. Богомолова, И.Н. Морфологические характерные изменения внутренних органов при некоторых видах сочетанных отравлений / И.Н. Богомолова, Д.В. Богомолов, Д.Ю. Шпехт, Б.Н. Кульбицкий // Судебно-медицинская экспертиза, 2012. – №2. – С.18 – 21.
13. Бонитенко, Е.Ю. Влияние ингибиторов алкогольдегидрогеназы на биохимические и гистологические изменения при экспериментальных отравлениях этиленгликолем и его эфирами / Е.Ю. Бонитенко, Р.В. Бабахаян, А.М. Есян // Нефрология, 2003. – №7 (3). – С. 60 – 66.
14. Бонитенко, Е.Ю. Острые отравления лекарственными средствами и наркотическими веществами / Е.Ю. Бонитенко, Ю.Ю. Бонитенко, Е.С. Бушуев, А.И. Головкин, Т.В. Горбачева, С.А. Куценко, С.П. Нечипоренко; под ред. проф. Ю.Ю. Бонитенко и проф. С.П. Нечипоренко. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2010. – 440 с.
15. Бушуев, Е.С., Летучие органические соединения: химико-токсикологический анализ / В.А. Башарин, Т.В. Горбачёва, М.Б. Фокин. – СПб.: ООО «Издательство «Левша. Санкт-Петербург», 2018. – 240 с.
16. Вандер, А. Физиология почек / А. Вандер; пер. с англ. под ред. Ю.В. Наточина, пер. Г.А. Лаписа. – СПб.: Питер, 2000. – 252 с.
17. Визель, А.О. Новый аспект фармакологического подхода к соединениям фосфора. Димефосфон / А.О. Визель, Р.С. Гараев; отв. ред. О.Г. Синяшин. – Казань: Изд-во «Печать-Сервис-XXI век», 2012. – 189 с.
18. Витер, В.И. Судебно-медицинская гистология. Руководство для врачей. Изд. 6-е перераб. и доп. / В.И. Витер, В.В. Кунгурова, С.В.Хасанянова, А.П.Столяров. – Ижевск: НП «ПУАСМЭ», 2018. – 249 с.
19. Возианов, А.Ф. Период вторичной олигурии в течении острой почечной недостаточности / А.Ф. Возианов, А.И. Гоженко, А.С. Федорук // Нефрология. – 2003. – №7 (3). – С. 29-34.
20. Галибин, Г.П. Токсикология промышленных соединений урана / Г.П. Галибин, Ю.В. Новиков; под ред. проф. Ю.И. Москалева. – М.: Атомиздат, 1976. – 184 с.
21. Гинецинский, А.Г. Физиологические механизмы водно-солевого равновесия / А.Г. Гинецинский. – М.-Л.: Изд. АН СССР, 1963. – 428 с.
22. Глезер, Г.А. Диуретики. Руководство для врачей / Г.А. Глезер. – М.: «Интербук-бизнес», 1993. – 352 с.
23. Гоженко, А.И. Патогенез токсических нефропатий / А.И. Гоженко // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2006. – № 2 (4). – С. 9 – 13.
24. Голигорский, С.Д. Острая почечная недостаточность / С.Д. Голигорский, Н.Т. Терехов. – Издательство «Здоров'я, Киев», 1969. – 260 с.

25. Голиков, С.Н. Общие механизмы токсического действия / С.Н. Голиков, И.В. Саноцкий, Л.А. Тиунов. – Л.: Медицина, 1986. – 280 с.
26. Гриневич, М.А. Информационный поиск перспективных лекарственных растений / М.А. Гриневич. – Л.: Наука, 1990. – 141 с.
27. Дударева, Л.А. Методы ранней лабораторной диагностики хронического тубулоинтерстициального нефрита, индуцированного приёмом нестероидных противовоспалительных препаратов / Л.А. Дударева, М.М. Батюшин, Д.С. Цветков // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. – 2013. – №2 (174). – С. 89 – 91.
28. Ермоленко, В.М. Острая почечная недостаточность: руководство / В.М. Ермоленко, А.Ю. Николаев. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 240 с.
29. Здравоохранение в России. 2017: Стат.сб./Росстат. [Электронный ресурс]. Федеральная служба государственной статистики – М., 3-46 2017. – 170 с. – Режим доступа: <https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/zdrav17.pdf>
30. Иваненко, Н.Б. Определение урана в моче методом масс-спектрометрии высокого разрешения с индуктивно связанной плазмой / Н.Б. Иваненко, Д.В. Наволоцкий, А.А. Иваненко, Н.Д. Соловьев, И.В. Блаженникова // Токсикология. – 2012. – Т13. – С.871 – 880.
31. Картамышева, Н.Н. Тубулоинтерстициальные изменения при хронических заболеваниях почек у детей / Н.Н. Картамышева, О.В. Чумакова, А.Г. Кучеренко. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 96 с.
32. Клинические рекомендации: Острое повреждение почек (ОПП). [Электронный ресурс]. – Ассоциация нефрологов, Научное общество нефрологов России, Ассоциация анестезиологов-реаниматологов России, Национальное общество специалистов в области гемաфереза и экстракорпоральной гемокоррекции, 2020. – 142 с. – Режим доступа: https://www.rusnephrology.org/wp-content/uploads/2020/12/AKI_final.pdf
33. Клинические рекомендации: Тубулоинтерстициальные болезни почек [Электронный ресурс]. – Ассоциация нефрологов, 2021. – 59 с. – Режим доступа: <https://rusnephrology.org/wp-content/uploads/2021/09/tubulointerstitial.pdf>
34. Коваль, Ю.Ф. Ускорение выведения из организма радиоактивных изотопов / Ю.Ф. Коваль; под ред. докт. мед. наук проф. Е.В. Гембицкого. – М.: Атомиздат, 1972. – 200 с.
35. Коржевский, Д.Э. Морфологическая диагностика. Подготовка материала для гистологического исследования и электронной микроскопии: руководство / Д.Э. Коржевский, Е.Г. Гилерович, О.В. Кирик, Е.Г. Сухорукова, И.П. Григорьев; под ред. Д.Э. Коржевского. – СПб.: СпецЛит, 2013. – 127 с.
36. Красильщикова, М.С., Белозерцева, И.В. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях.

Rus-LASA: Объединение специалистов по работе с животными [Электронный ресурс]. – СПб, 2010. – Режим доступа: https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf

37. Кукес, В.Г. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей / В.Г. Кукес. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 304 с.

38. Лебедев, Н.В. Системы объективной оценки тяжести состояния больных и пострадавших / Н.В. Лебедев. – М.: Издательство БИНОМ, 2015. – 160 с.

39. Лекарственная болезнь (поражения в связи с применением фармакотерапевтических средств в лечебных дозах) / под ред. проф. Г. Маждракова и проф. П. Попхристова, перераб и доп., пер. с болг. Т.В. Матвеевой, С.И. Влахова. – София: Изд. «Медицина и физкультура», 1973. – 605 с.

40. Лесиовская, Е.Е. Методические подходы к доклинической оценке эффективности нефропротекторов / Е.Е. Лесиовская, К.В. Сивак, В.О. Николаев, Р.Д. Сюбаев, О.Л. Верстакова, В.Г. Бобылев, А.Н. Богданов // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2007. – № 2. – С. 91-96.

41. Ливанов, Г.А., Михальчук, М.А., Калмансон, М.Л. Острая почечная недостаточность при критических состояниях / Г.А. Ливанов, М.А. Михальчук, М.Л. Калмансон; под ред. С.Ф. Багненко. – СПб.: Издательский дом СПбМАПО, 2005. – 204 с.

42. Литвинова, О.С. Токсикологический мониторинг причин острых отравлений химической этиологии в Российской Федерации / О.С. Литвинова, М.В. Калиновская // Токсикологический вестник. – 2017. – №1(142). – С.5 – 9.

43. Лужников, Е.А. Детоксикационная терапия: Руководство / Е.А. Лужников, Ю.С. Гольдфарб, С.Г. Мусселиус. – СПб.: Лань, 2000. – 192 с.

44. Лужников, Е.А. Эндотоксикоз при острых экзогенных отравлениях / Е.А. Лужников, Ю.С. Гольдфарб, А.М. Марупов. – М.: Издательство БИНОМ, 2008. – 200 с.

45. Максимов, М.Л. Фармакотерапия, проверенная временем: от механизмов к клинической эффективности / М.Л. Максимов, А.И. Малыгина, А.А. Шикалева // РМЖ. – 2020. – №9. – С.71 – 76.

46. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.

47. Мировая статистика здравоохранения, 2017 г.: мониторинг показателей здоровья в отношении Целей устойчивого развития [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/279717>.

48. Мусселиус, С.Г. Отравления грибами / С.Г. Мусселиус, А.А. Рык. – М., 2002. – 324 с.

49. Назаров, А.В. Проведение гемодиализа у больных с риском кровотечения / А.В. Назаров, В.Г. Сенцов, В.А. Суханов // Эфферентные методы в медицине. – 1992. – С. 15 – 17.
50. Назаров, А.В. Современные технологические подходы к стабилизации крови при экстракорпоральной детоксикации у больных с острыми отравлениями: дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.37, 14.00.20 / Назаров Андрей Владимирович. – Екатеринбург, 2005. – 279 с.
51. Наточин, Ю.В. Проблемы эволюционной физиологии водно-солевого обмена / Ю.В. Наточин. – Л.: Наука, 1984. – 40 с.
52. Николаев, А.Ю. Лечение почечной недостаточности: Руководство для врачей / А.Ю. Николаев, Ю.С. Милованов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2011. – 592 с.
53. Осложнения фармакотерапии. Неблагоприятные побочные реакции лекарственных средств. Том 1 / под ред. Д.В. Рейхарта. – М.: Литтерра, 2007. – 256 с.
54. Остапенко, Ю.Н. Больничная летальность при острых отравлениях химической этиологии в 2005-2006 гг. / Ю.Н. Остапенко. // Проблемы стандартизации и внедрения современных диагностических и лечебных технологий в практической токсикологической помощи пострадавшим от острых химических воздействий: тез. Росс. науч. конф., 25 – 26 сентября 2008 г. / Ю.Н. Остапенко; под науч. ред. проф. Сенцова В.Г. – Екатеринбург: Изд-во Уральской государственной медицинской академии, 2008. – С. 18 – 19.
55. Острая почечная недостаточность: руководство / В.М. Ермоленко, А.Ю. Николаев. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. – 240 с.
56. Остроумова, О.Д. Лекарственно-индуцированный острый канальцевый некроз / О.Д. Остроумова, М.В. Клепикова, К.К. Джамихов, В.А. Дё, С.Н. Литвинова // Сибирское медицинское обозрение. – 2020. – №5 (125). – С. 49 – 62.
57. Острые отравления этанолом и его суррогатами / под общ. ред. проф. Ю.Ю. Бонитенко. – СПб.: «ЭЛБИ-СПб», 2005. – 224 с.
58. Отравление лекарственными средствами, медикаментами и биологическими веществами (Т36-Т50). МКБ 10 – Международная классификация болезней 10-го пересмотра [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://mkb-10.com/index.php?pid=19026>.
59. Пермяков, Н.К. Патология реанимации и интенсивной терапии / Н.К. Пермяков. – М.: Медицина, 1985. – 288 с.
60. Пилотович, В.С. Хроническая болезнь почек. Методы заместительной почечной терапии / В.С. Пилотович, О.В. Калачик. – М.: Мед. лит., 2009. – 288 с.
61. Попов, С.В. Ренопротекторная активность фумаратсодержащего инфузионного раствора при ишемии - реперфузии почки / С.В. Попов, К.В. Сивак, Р.Г. Гусейнов, М.Б. Борисенко, О.Н. Скрыбин, П.К. Яблонский, Т.И. Виноградова, М.М. Мирзабеков, М.М.

Сулейманов, М.Л. Витовская, Р.А. Щеголева, Н.В. Заболотных // Экспериментальная и клиническая урология. – 2014. – №3. – С. 14-18.

62. Попов, С.В. Тепловая ишемия почки / С.В. Попов, О.Н. Скрябин, Р.Г. Гусейнов, К.В. Сивак. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 272 с.

63. Почечная недостаточность и заместительная терапия (Компетентное лечение критических состояний) / под ред. Е.А. Стецюка, пер. с англ. А.В. Бегачева, Е.А. Стецюка. – М.: Издательский дом Видар-М, 2013. – 160 с.

64. Почки / под ред. Ф.К. Мостофи, Д.Е. Смит, перевод с англ. проф. В.С. Крылова, предисл. акад. Б.В. Петровского. – М.: Медицина, 1972. – 464 с.

65. Принципы и методы оценки нефротоксичности, связанной с воздействием химических веществ. Гигиенические критерии состояния окружающей среды; 119 (EUR 13222) [Электронный ресурс]. – Всемирная организация здравоохранения, Женева, 1994. – Режим доступа: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/144580>

66. Рябов, С.И., Наточин, Ю.В. Функциональная нефрология / С.И. Рябов, Ю.В. Наточин, оформл. С. Шапиро. – СПб: Лань, 1997. – 304 с.

67. Савчук, С.А. Обнаружение и количественное определение летучих токсических веществ и гликолей в биологических объектах методом газожидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. Информационное письмо / С.А. Савчук, Л.Н. Ризванова, Ф. Тальяро, Дж. Музиле [Электронный ресурс]. – М., 2019. – 60 с. – Режим доступа: <https://sudmed-ms.ru/Articles/RCSME-VOL-2019/RCSME-VOL-2019.pdf>

68. Сапин, М.Р. Функциональная анатомия органов малого таза (монография) / М.Р. Сапин, Д.Б. Никитюк, С.В. Чава. – Элиста: ЗАОр НПП «Джангар», 2011. – 64 с.

69. Сенцов, В.Г. Острая почечная недостаточность при острых отравлениях / В.Г. Сенцов, П.В. Журилин / Проблемы стандартизации и внедрения современных диагностических и лечебных технологий в практической токсикологической помощи пострадавшим от острых химических воздействий: Тез. Росс. науч. конф. / Под науч. ред. проф. Сенцова В.Г. (Екатеринбург, 25-26 сентября 2008 г.) – Екатеринбург: Изд-во ГОУ ВПО УГМА Росздрава, 2008. – С. 80 – 82.

70. Сивак, К.В. Доказательная фитотерапия. Руководство для врачей и провизоров / К.В. Сивак, Е.Е. Лесиовская. – Санкт-Петербург, 2021. V том. – 275 с.

71. Смирнов, А.В. Острое повреждение почек / А.В. Смирнов, В.А. Добронравов, А.Ш. Румянцев, И.Г. Каюков. – Москва: МИА; 2015. – 488 с.

72. Смирнов, А.В. Острое повреждение почек / А.В. Смирнов, А.Ш. Румянцев // Часть I. Нефрология. – 2020. – т. 24(1). – С. 67 – 95.

73. Тедтоева, А.И. Перекисное окисление липидов, активность Na^+ , K^+ -АТФ-азы и ферментов антиоксидантной защиты при нефропатии у крыс, индуцированной хлоридом кобальта / А.И. Тедтоева, Ф.С. Дзугкоева, И.В. Можаяева, С.Г. Дзугкоев // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56. – С. 540 – 544.
74. Токсическое действие веществ, преимущественно немедицинского назначения (Т51-Т65). МКБ 10 – Международная классификация болезней 10-го пересмотра [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://mkb-10.com/index.php?pid=19180>.
75. Тубулоинтерстициальные и тубулярные поражения, вызванные лекарствами и тяжелыми металлами (N14). МКБ 10 – Международная классификация болезней 10-го пересмотра [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://mkb-10.com/index.php?pid=13119>.
76. Чиж, А.С. Протеинурия: клиническое значение и патогенез / А.С. Чиж. – Минск: Вышэйшая школа, 1983. – 142 с.
77. Шиманко, И.И. Поражения почек при острых экзогенных отравлениях / И.И. Шиманко. – М.: Медицина, 1977. – 206 с.
78. Шулуток, Б.И. Вторичные нефропатии: Клинико-морфологическое исследование / Б.И. Шулуток. – Л.: Медицина, 1987. – 208 с.
79. Шюк, О. Функциональное исследование почек / О. Шюк. – изд.1-е русское. – Прага ЧССР: Медицинское изд-во Авиценум, 1975. – 334 с.
80. Abreu de Castro, B.B. Standardizing kidney function evaluation in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the vivarium of the Federal University of Juiz de Fora / B.B. Abreu de Castro, F.A.B. Colugnati, M.A. Cenedeze [et al.] // *J Bras Nefrol.* – 2014. – V.36. – P.139 – 149.
81. Adam, J. Renal Cyst Formation in Fh1-Deficient Mice Is Independent of the Hif/Phd Pathway: Roles for Fumarate in KEAP1 Succination and Nrf2 Signaling / J. Adam, E. Hatipoglu, L. O'Flaherty [et al.] // *Cancer Cell.* – 2011. – V.20, №4. – P. 524 – 537.
82. Afjal, M.A. Anti-inflammatory role of tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl) in nephroprotection / M.A. Afjal, S.H. Abdi, S. Sharma [et al.] // *Human and Experimental Toxicology.* – 2019. – V.38, №6. – P. 713 – 723.
83. Ahn, J.Y. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictive biomarker for the detection of acute kidney injury in adult poisoning / J.Y. Ahn, M.J. Lee, J.S. Seo [et al.] // *Clinical Toxicology.* – 2016. – V.54, №2. – P. 127 – 133.
84. Agostini, M. Acute renal failure from organophosphate poisoning: a case of success with haemofiltration / M. Agostini, A. Bianchin // *Hum Exp Toxicol.* – 2003. – V.22. – P. 165 – 167.
85. Albert, C. Biomarker-Guided Risk Assessment for Acute Kidney Injury: Time for Clinical Implementation? / C. Albert, M. Haase, A. Albert [et al.] // *Annals of Laboratory Medicine.* – 2020. – V.41, №1. – P.1 – 15.

86. Alhamad, T. Acute kidney injury with oxalate deposition in a patient with a high anion gap metabolic acidosis and a normal osmolal gap / T. Alhamad, J. Blandon, A.T. Meza [et al.] // *Journal of nephropathology*. – 2013. – V.2, №2. – P. 139–143.
87. Almufti, R. A critical review of the analytical approaches for circulating tumor biomarker kinetics during treatment / R. Almufti, M. Wilbaux, A. Oza [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2014. – V.25, № 1. – P. 41 – 56.
88. Ali, B.H. Renal and Myocardial Histopathology and Morphometry in Rats with Adenine-Induced Chronic Renal Failure: Influence of Gum Acacia / B.H. Ali, I. Inuwa, M. Al Za'abi [et al.] // *Cell Physiol. Biochem*. – 2014. V.34, № 3. – P. 818 – 828.
89. Aličelebić, S. Proximal convoluted tubules of the rats kidney – a stereological analysis / S. Aličelebić // *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. – 2003. – V.3, №1. – P. 36 – 39.
90. Aljefri, D.M. Vancomycin Area under the Curve and Acute Kidney Injury: A Meta-analysis / D.M. Aljefri, S.N. Avedissian, N.J. Rhodes [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2019. – V.11, №69. – P. 1881 –1887.
91. Al-Naimi, M. Nephrotoxicity: Role and significance of renal biomarkers in the early detection of acute renal injury / M.S. Al-Naimi, H.A. Rasheed, N.R. Hussien [et al.] // *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*. – 2019. – V.10, №3. – P.95 – 99.
92. Anantharam, P. Improved tissue-based analytical test methods for orellanine, a biomarker of Cortinarius mushroom intoxication / P. Anantharam, D. Shao, P.M. Imerman [et al.] // *Toxins (Basel)*. – 2016. – V.5, №8. – 16 p.
93. *Animal clinical chemistry: a practical handbook for toxicologists and biomedical researchers* / G.O. Evan; edited by G.O. Evans. – 2nd ed. – CRC Press and Taylor & Francis Group, 2009. – 345 p.
94. Andrade, L. Acute kidney injury as a condition of renal senescence / L. Andrade, C.E. Rodrigues, S.A. Gomes, I.L. Noronha // *Cell Transplantation*. – 2018. – V.27, №5. – P.739 – 753.
95. Andreucci, M. The potential use of biomarkers in predicting contrast-induced acute kidney injury / M. Andreucci, T. Faga, E. Riccio [et al.] // *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*. – 2016. – V.9. – P.205 – 221.
96. Andreucci, M. The ischemic/nephrotoxic acute kidney injury and the use of renal biomarkers in clinical practice / M. Andreucci, T. Faga, A. Pisani [et al.] // *European Journal of Internal Medicine*. – 2017. – V.39 – P.1 – 8.
97. Andrews, P.M. A technique to reduce fixation artifacts to kidney proximal tubules / P.M. Andrews, A.K. Coffey // *Kidney International*. – 1984. – V.6, №25. – P.964 – 968.

98. Andrianova, N.V. Kidney cells regeneration: dedifferentiation of tubular epithelium, resident stem cells and possible niches for renal progenitors / N.V. Andrianova, M.I. Buyan, L.D. Zorova [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – V.20, №24. – 6326 p.
99. Anger, E.E. Aristolochic Acid-Induced Nephrotoxicity: Molecular Mechanisms and Potential Protective Approaches / E.E. Anger, F. Yu, J. Li // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – V.3, №2. – 1157.
100. Antonowicz-Juchniewicz, J. Secondary nephropathies in occupational health practice. I. Secondary nephropathies due to occupational exposure / J. Antonowicz-Juchniewicz, A. Jodkowska, D. Kwiecińska // *Medycyna pracy*. – 2006. – V.4, №57. – P.389 – 400.
101. Archer L., Cohen F., Rodriguez F., & Ober C.K. (2004). *Toxicology of the Kidney* (L.H. Lash, & J.B. Tarloff, Eds.) (3rd ed.). CRC Press. – 1200 p.
102. Ardakani, A.A. Scintigraphic texture analysis for assessment of renal allograft function / A.A. Ardakani, S. Hekmat, J. Abolghasemi, R. Reiazi // *Polish Journal of Radiology*. – 2018. – V.83. – P.1 – 10.
103. Armaly, Z. Effects of carnitine on oxidative stress response to intravenous iron administration to patients with CKD: impact of haptoglobin phenotype / Z. Armaly, A. A. El Qader, A. Jabbour [et al.] // *BMC Nephrology*. – 2015. – V.1, №16. – 135.
104. Arzuaga, X. Renal effects of exposure to natural and depleted uranium: A review of the epidemiologic and experimental data / X. Arzuaga, S.H. Rieth, A. Bathija, G.S. Cooper // *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*. – 2010. – V.7–8 (13). – P.527 – 545.
105. Assayag, M. Renal failure during chemotherapy: renal biopsy for assessing subacute nephrotoxicity of pemetrexed / M. Assayag, P. Rouvier, M. Gauthier [et al.] // *BMC Cancer*. – 2017. – V.1, №17. – 770.
106. Atlante, A. Fumarate permeation in rat liver mitochondria: Fumarate/malate and fumarate/phosphate translocators / A. Atlante, S. Passarella, S. Giannattasio, E. Quagliariello // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1985. – V.1, №132. – P.8 – 18.
107. Atlante, A. Fumarate permeation in normal and acidotic rat kidney mitochondria: Fumarate/malate and fumarate/aspartate translocators / A. Atlante, S. Gagliardi, S. Passarella // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1998. – V.3, №243. – P.711 – 718.
108. Aw, M. Body mass-specific Na⁺-K⁺-ATPase activity in the medullary thick ascending limb: implications for species-dependent urine concentrating mechanisms / M. Aw, T.M. Armstrong, C.M. Nawata [et al.] // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2018. – V.4, №314. – P.563 – 573.

109. Aztatzi-Aguilar, O.G. Early kidney damage induced by subchronic exposure to PM2.5 in rats / O.G. Aztatzi-Aguilar, M. Uribe-Ramírez, J. Narváez-Morales [et al.] // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2016. – V.1, №13. – 68.
110. Babele, P. Elucidation of protein biomarkers in plasma and urine for epsilon toxin exposure in mouse model / P. Babele, S. Verma, R.B. Kumar [et al.] // *Anaerobe*. – 2019. – V.59. – P.76 – 91.
111. Baisantry, A. Autophagy induces prosenescent changes in proximal tubular S3 segments / A. Baisantry, S. Bhayana, S. Rong [et al.] // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2016. – V.6, №27. – P.1609 – 1616.
112. Bamgbola, O. Review of vancomycin-induced renal toxicity: an update / O. Bamgbola // *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*. – 2016. – V.7, №3. – P. 136 – 147.
113. Bao, Y. Efficacy of a novel chelator BPCBG for removing uranium and protecting against uranium-induced renal cell damage in rats and HK-2 cells / Y. Bao, D. Wang, Zh. Li [et al.] // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2013. – V.269, №1. – P.17 – 24.
114. Barth, R.H. Urea modeling and Kt/V: a critical appraisal / R.H. Barth // *Kidney international. Supplement*. – 1993. – V.41. – P.252 – 260.
115. Basile, D.P. Pathophysiology of acute kidney injury / D.P. Basile, M.D. Anderson, T.A. Sutton // *Comprehensive Physiology*. – 2012. – V. 2, №2. – P.1303 –1353.
116. Baudoux, T. CD4+ and CD8+ T cells exert regulatory properties during experimental acute aristolochic acid nephropathy / Th. Baudoux, C. Husson, E. De Prez [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – V.8. – 5334.
117. Beaumier, M. Mushroom poisoning presenting with acute kidney injury and elevated transaminases / M. Beaumier, J.-Ph. Rioult, M. Georges [et al.] // *Kidney International Reports*. – 2019. V.4, №6. – P.877 – 881.
118. Beitland, S. Urine biomarkers give early prediction of acute kidney injury and outcome after out-of-hospital cardiac arrest / S. Beitland, B.E. Waldum-Grevbo, E.R. Nakstad [et al.] // *Critical Care*. – 2016. – V.20, №1. – 314.
119. Belavgeni, A. Ferroptosis and necroptosis in the kidney / A. Belavgeni, C. Meyer, J. Stumpf [et al.] // *Cell Chemical Biology*. – 2020. – V.4, №20. – P.448 – 462.
120. Betz, B.B. Urinary peptidomics in a rodent model of diabetic nephropathy highlights epidermal growth factor as a biomarker for renal deterioration in patients with type 2 diabetes / B.B. Betz, S.J. Jenks, A.D. Cronshaw [et al.] // *Kidney International*. – 2016. – V.89, №5. – P.1125 – 1135.
121. Bever, C.S. Lateral flow immunoassay (LFIA) for the detection of lethal amatoxins from mushrooms / C.S. Bever, C.A. Adams, R.M. Hnasko [et al.] // *PLoS One*. – 2020. – V.15, №4. – e0231781.

122. Bever, C.S. Rapid, sensitive, and accurate point-of-care detection of lethal amatoxins in urine / C.S. Bever, K.D. Swanson, E.I. Hamelin [et al.] // *Toxins*. – 2020. – V.2, №12. –123.
123. Bjørklund, G. Insights on alpha lipoic and dihydrolipoic acids as promising scavengers of oxidative stress and possible chelators in mercury toxicology / G., Bjørklund, J. Aaseth, G. Crisponi [et al.] // *Journal Inorg Biochem*. – 2019. – 195. P. 111 – 119.
124. Blacher, J. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease Lippincott Williams and Wilkins / J. Blacher, A. P. Guerin, B. Pannier [et al.] // *Hypertension*. – 2001. – V.4, №38. – P.938 –942.
125. Bland, S.K. A specific immunoassay for detection of feline kidney injury molecule 1 / S. K. Bland, M. E. Clark, O. Côté , D. Bienzle // *Journal of Feline Medicine and Surgery*. – 2018. – V.21, №12. – P.1069 – 1079.
126. Bohets, H.H. Cytotoxicity of mercury compounds in LLC-PK1, MDCK and human proximal tubular cells / H. H. Bohets, M. N. Van Thielen, I. Van der Biest [et al.] // *Kidney International*. – 1995. – V. 47, № 2. – P. 395 – 403.
127. Bohle, A. Significance of tubulointerstitial changes in the renal cortex for the excretory function and concentration ability of the kidney: A morphometric contribution / A. Bohle, S. Mackensen-Haen, H. Gise // *American Journal of Nephrology*. – 1987. – V.7, №6. – P. 421 – 433.
128. Bomhard, E.M. Time course of chronic oral cadmium nephrotoxicity in Wistar Rats: excretion of urinary enzymes / E.M. Bomhard, D. Maruhn, M. Rinke // *Drug and Chemical Toxicology*. – 1999. – V. 22, №4. – P. 679 – 703.
129. Bonavia, A. A review of the role of immune cells in acute kidney injury / A. Bonavia, K. Singbartl // *Pediatric Nephrology*. – 2018. – V. 33, № 10. – P.1629 –1639.
130. Bontemps, A. In vivo comparison of the phenotypic aspects and molecular mechanisms of two nephrotoxic agents, sodium fluoride and uranyl nitrate / A. Bontemps, L. Conquet, Ch. Elie [et al.] // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2019. – V.16, №7. – 1136.
131. Bonventre, J.V. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure / J.V. Bonventre // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2003. – V.14, № SUPPL. 1. – P.55 – 61.
132. Bonventre, J.V. Maladaptive proximal tubule repair: Cell cycle arrest / J.V. Bonventre // *Nephron Clin Pract*. – 2014. – V.127, №1–4. – P.61 – 64.
133. Bonventre, J.V. Primary proximal tubule injury leads to epithelial cell cycle arrest, fibrosis, vascular rarefaction, and glomerulosclerosis / J.V. Bonventre // *Kidney International Supplements*. – 2014. –V.4, № 1. – P.39 – 44.

134. Borenfreund, E. Comparison of two in vitro cytotoxicity assays – the neutral red (NR) and tetrazolium (MTT) tests / E. Borenfreund, H. Babich, N. Martin-Alguacil // *Toxicol. In Vitro.* – 1988. – V.2, №1. – P.1 – 6.
135. Borrás-Blasco, J. Acute renal failure associated with an accidental overdose of colchicine / J. Borrás-Blasco, R. Enriquez, A.E. Sirvent [et al.] // *International Journal of clinical pharmacology and therapeutics.* – 2005. – V.43, №10. – P. 480 – 484.
136. Breglia, A. Subclinical contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing cerebral computed tomography / A. Breglia, I. Godi, G. M. Virzi [et al.] // *Cardiorenal Medicine.* – 2020. – V.10, №2. – P.1 – 12.
137. Brent, J. Fomepizole for the treatment of ethylene glycol poisoning / J. Brent, K. McMartin, S. Phillips [et al.] // *New England Journal of Medicine.* – 1999. – V. 340, № 11. – P.832 – 838.
138. Brobst D. Urinalysis and associated laboratory procedures / D. Brobst // *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice.* – 1989. – V.19, №5. – P.929 – 949.
139. Brondz, I. Structure Elucidation of a New Toxin from the Mushroom *Cortinarius rubellus* Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) / I. Brondz // *International Journal of Analytical Mass Spectrometry and Chromatography.* – 2013. – V.1, № 2. – P. 109 – 118.
140. Brown, D.L. Postnatal development of the rat kidney [Electronic resource] / D.L. Brown, B.E. Walling, M.E. Mattix. – Available at: <https://www.criver.com/sites/default/files/resources/PostnatalDevelopmentoftheRatKidney.PDF>
141. Bruchim, Y. Urinary heat shock protein 72 as a biomarker of acute kidney injury in dogs / Y. Bruchim, Y. Avital, M. Horowitz [et al.] // *The Veterinary Journal.* – 2017. – V.225. – P.32 – 34.
142. Bunawan, N.C. Djenkolism: case report and literature review / N.C. Bunawan, A. Rastegar, K.P. White, N.E. Wang // *Int Med Case Rep Journal* – 2014. – V.7. – P.79 – 84.
143. Burckhardt, B.C. Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells / B.C. Burckhardt, G. Burckhardt // *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* – 2003. – V.146. – P.95 – 158.
144. Burns, W.C. The role of tubular epithelial-mesenchymal transition in progressive kidney disease / W.C. Burns, P. Kantharidis, M.C. Thomas // *Cells Tissues Organs.* – 2007. – V.185, № 1–3. – P.222 – 231.
145. Buvall, L. Orellanine specifically targets renal clear cell carcinoma / L. Buvall, H. Hedman, A. Khramova, D. Najjar [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – V.8, №53. – P.91085 – 91098.
146. Cabello R. Urinary cyclophilin A as marker of tubular cell death and kidney injury / R. Cabello, M. Fontecha-Barriuso, D. Martin-Sanchez [et al.] // *Biomedicines.* – 2021. – V.9, №2. – P.1 – 19.

147. Campos, M.A.A. In vitro evaluation of biomarkers of nephrotoxicity through gene expression using gentamicin / M.A.A. Campos, L.A. de Almeida, M.F. Grossi, C.A. Tagliati // *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. – 2018. – V. 32, № 9. – 22189.
148. Candiano, G. 2D-electrophoresis and the urine proteome map: Where do we stand? / G. Candiano, L. Santucci, A. Petretto [et al.] // *Journal of Proteomics*. – 2010. – V.73, №5. – P.829–844.
149. Cantin, D. Chromatographic behaviour and determination of orellanine, a toxin from the mushroom *Cortinarius orellanus* / D. Cantin // *Journal of Chromatography A*. – 1989. – №1 (478). – P.231–237.
150. Cao, W. AOPPs and the progression of kidney disease / W. Cao, F.F. Hou, J. Nie // *Kidney International Supplements*. – 2014. – V.4, №1. – P. 102–106.
151. Cárdenas, A. Markers of early renal changes induced by industrial pollutants. I. Application to workers exposed to mercury vapour / A. Cárdenas, H. Roels, A.M. Bernard [et al.] // *Br J Ind Med.*, 1993. – V.50, №1. – P.17–27.
152. Carpenter, T.C. Endothelin receptor blockade decreases lung water in young rats exposed to viral infection and hypoxia / T.C. Carpenter, K.R. Stenmark // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2000. V.279, №3. – P.547–554.
153. Carter, J.L. Biological variation of plasma and urinary markers of acute kidney injury in patients with chronic kidney disease / J.L. Carter, Ch.T. Parker, P.E. Stevens [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 2016. – V.62, №6. – P.876–883.
154. Casanova, A.G. Key role of oxidative stress in animal models of aminoglycoside nephrotoxicity revealed by a systematic analysis of the antioxidant-to-nephroprotective correlation / A.G. Casanova, L. Vicente-Vicente, M.T. Hernández-Sánchez [et al.] // *Toxicology*. – 2017. – V.385. – P.10–17.
155. Chadha, V. Measurement of urinary concentration: A critical appraisal of methodologies / V. Chadha, U. Garg, U.S. Alon // *Pediatric Nephrology*. – 2001. – V.16, № 4. – P.374–382.
156. Chang, C.-C. The efficacy of semi-quantitative urine protein-to-creatinine (P/C) ratio for the detection of significant proteinuria in urine specimens in health screening settings / C.-C. Chang, M.-J. Su, J.-L. Ho [et al.] // *SpringerPlus*. – 2016. – V.5, № 1. – 1791.
157. Chang, F.C. Novel insights into pericyte-myofibroblast transition and therapeutic targets in renal fibrosis / F.-C. Chang, Y.-H. Chou, Y.-T. Chen [et al.] // *Journal of the Formosan Medical Association*. – 2012. – V.111, № 11. – P.589–598.
158. Chavan, H. The ATP-Binding cassette transporter ABCB6 is induced by arsenic and protects against arsenic cytotoxicity / H. Chavan, M. Oruganti, P. Krishnamurthy // *Toxicological Sciences*. – 2011. – V.2, № 120. – P.519–528.

159. Chávez-Iñiguez, J.S. Oral acyclovir induced hypokalemia and acute tubular necrosis a case report / J.S. Chávez-Iñiguez, R. Medina-Gonzalez, L. Aguilar-Parra [et al.] // *BMC Nephrology*. – 2018. – V.19, №1. – 324.
160. Chawla, L.S. Association between AKI and long-term renal and cardiovascular outcomes in united states veterans / L.S. Chawla, R.L. Amdur, A.D. Shaw [et al.] // *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. – 2014. – V.9, №3. – P.448 – 456.
161. Chen, D.Q. Diuretic and anti-diuretic activities of fractions of *Alismatis rhizoma* / D.-Q. Chen, Y.-L. Feng, T. Tian [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2014. – V.157. – P. 114–118.
162. Chen, H. Hydroxycarboxylic acid receptor 2 mediates dimethyl fumarate's protective effect in EAE / H. Chen, J.C. Assmann, A. Krenz [et al.] // *Journal Clin. Invest.* – 2014. – V.124, N.5. – P. 2188 - 2192.
163. Chen, J. Epigallocatechin-3-gallate attenuates cadmium-induced chronic renal injury and fibrosis / J. Chen, L. Du, J. Li, H. Song // *Food and Chemical Toxicology*. – 2016. – V.96. – P. 70 – 78.
164. Chen, J.F. TRAP1 ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction by protecting renal tubular epithelial cell mitochondria / J.-F. Chen, Q.-S. Wu, Y.-X. Xie [et al.] // *FASEB Journal*. – 2017. – V.10. – P.4503 – 4514.
165. Chen, J. Discovery of 1-(4-((3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)amino)benzyl)-5-(trifluoromethyl)pyridin-2(1H)-one, an orally active multi-target agent for the treatment of diabetic nephropathy / J. Chen, Zh. Peng, M. Lu [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2018. – V.28, №2. – P.222 – 229.
166. Chen, S. Alpha lipoic acid attenuates cadmium-induced nephrotoxicity via the mitochondrial apoptotic pathways in rat / S. Chen, G. Liu, M. Long [et al.] // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2018. – V.184. – P.19 – 26.
167. Chen, Y. Perspectives on using a multiplex human kidney safety biomarker panel to detect cisplatin-induced tubular toxicity in male and female *Cynomolgus* monkeys / Y. Chen, J.D. Thurman, L.B. Kinter [et al.] // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2017. – V.336. – P.66 – 74.
168. Chen, Y.T. Effects of sodium citrate on melamine-cyanuric acid mixture-induced urolithiasis in rats / Y.-T. Chen, S.-L. Hsuan, B.-P. Jiann [et al.] // *Clinica Chimica Acta*. – 2013. – V.424. – P.76–82.
169. Chen Y.T. Kidney stone distribution caused by melamine and cyanuric acid in rats / Y.-T. Chen, B.-P. Jiann, C.-H. Wu [et al.] // *Clinica Chimica Acta*. – 2014. – V.430. – P.96 – 103.
170. Chen, Y.-H. Effect of blood sample type on the measurement of advanced oxidation protein products as a biomarker of inflammation and oxidative stress in hemodialysis patients / Y.-H. Chen, W. Shi, X.-L. Liang [et al.] // *Biomarkers*. – 2011. – V.16, №2. – P.129 – 135.

171. Cheng, P. Multiplex Optical Urinalysis for Early Detection of Drug-Induced Kidney Injury / P. Cheng, Q. Miao, J. Huang [et al.] // *Anal. Chem.* – 2020. – V.8, №92. – P.6166 - 6172.
172. Chetyrkin, S.V. Pyridoxamine lowers kidney crystals in experimental hyperoxaluria: A potential therapy for primary hyperoxaluria / S. V. Chetyrkin, D. Kim, J. M. Belmont [et al.] // *Kidney International.* – 2005. – V.67, №1. – P.53 – 60.
173. Chevalier, R.L. The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: role of the glomerulotubular junction / R.L. Chevalier // *American Journal of Physiology – Renal Physiology.* – 2016. – V.311, №1. – P.145–161.
174. Chogtu, B. Rifampicin-Induced Concomitant Renal Injury and Hepatitis / B. Chogtu // *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR.* – 2016. – V.10, №9. – P.18–19.
175. Christ, M. Value of aldosterone receptor blockade in diuretic therapy of patients with chronic heart failure / M. Christ, N. Ludwig, B. Maisch // *Herz.* – 2002. – V.27, №2. – P.135 – 149.
176. Chuck, A.J. Comparison of urinary glycosaminoglycan excretion in rheumatoid arthritis, osteoarthritis, myocardial infarction, and controls / A.J. Chuck, J. Murphy, J.B. Weiss, D.M. Grennan // *Annals of the Rheumatic Diseases.* – 1986. – V.45, №2. – P.162 – 166.
177. Coentro, J.Q. Collagen quantification in tissue specimens / J.Q. Coentro, H. Capella-Monsonís, V. Graceffa [et al.] // *Methods Mol Biol.* – 2017. – V.1627. – P.341 – 350.
178. Cohen, S.M. Possible role of dimethylarsinous acid in dimethylarsinic acid-induced urothelial toxicity and regeneration in the rat / S.M. Cohen, L.L. Arnold, E. Uzvolgyi [et al.] // *Chemical Research in Toxicology.* – 2002. – V.15, № 9. – P.1150 – 1157.
179. Collins, N.D. Artificially increased serum bicarbonate values in two horses and a calf with severe rhabdomyolysis / N.D. Collins, B.E. LeRoy, L. Vap // *Veterinary clinical pathology.* – 1998. – V.3, №27. – P.85 – 90.
180. Colombo, G. A central role for intermolecular dityrosine cross-linking of fibrinogen in high molecular weight advanced oxidation protein product (AOPP) formation / G. Colombo, M. Clerici, D. Giustarini [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects.* – 2015. – V.1850, №1. – P.1 – 12.
181. Conlee, K.M. Carbon dioxide for euthanasia: concerns regarding pain and distress, with special reference to mice and rats / K.M. Conlee, M.L. Stephens, A.N. Rowan, L.A. King // *Laboratory Animals.* – 2005. – V.39, № 2. – P.137 – 161.
182. Connolly, M. Prediction of contrast induced acute kidney injury using novel biomarkers following contrast coronary angiography / M. Connolly, M. Kinnin, D. McEneaney [et al.] // *QJM: An International Journal of Medicine.* – 2018. – V.111, № 2. – P.103 – 110.

183. Constantiner, M. A dipstick protein and specific gravity algorithm accurately predicts pathological proteinuria / M. Constantiner, A. R. Sehgal, L. Humbert [et al.] // *American Journal of Kidney Diseases*. – 2005. – V.45, №5. – P.833 – 841.
184. Cortazar, F.B. Clinicopathological features of acute kidney injury associated with immune checkpoint inhibitors / F.B. Cortazar K.A. Marrone, M.L. Troxell [et al.] // *Kidney International*. – 2016. – V.90, № 3. – P.638 – 647.
185. Cosyns, J.P. Aristolochic acid and 'Chinese herbs nephropathy': a review of the evidence to date /J.P. Cosyns // *Drug Saf*. – 2003. – V.26, №1. – P.33 – 48.
186. Coutinho A.G.G. The aminoglycoside antibiotic gentamicin is able to alter metabolic activity and morphology of MDCK-C11 cells: a cell model of intercalated cells /A.G.G. Coutinho, S.M.P. Biscaia, R. Fernandez, A.L. Tararthuch // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. – 2018. – V.51, № 10. – 7417.
187. Cox, Z.L. Adverse drug events during AKI and its recovery / Z.L. Cox, A.B. McCoy, M.E. Matheny [et al.]// *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. – 2013. – V.8, № 7. – P. 1070 – 1078.
188. Cristani, M. Circulating advanced oxidation protein products as oxidative stress biomarkers and progression mediators in pathological conditions related to inflammation and immune dysregulation / M. Cristani, A. Speciale, A. Saija [et al.] // *Current medicinal chemistry*. – 2016. – V.23, № 34. – P.3862 – 3882.
189. Curthoys, N.P. Characterization and physiological function of rat renal γ -glutamyltranspeptidase / N.P. Curthoys, R.P. Hughey // *Enzyme*. –1979. – V.24, № 6. – P.383 – 403.
190. da Silva Melo, D.A. Evaluation of renal enzymuria and cellular excretion as an marker of acute nephrotoxicity due to an overdose of paracetamol in Wistar rats / D. A. da Silva Melo, V. Custódio Saciura, J.A. Tesser Poloni [et al.] // *Clinica Chimica Acta*. – 2006. – V.373, №1–2. – P.88 – 91.
191. D’Arcy, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy / M.S. D’Arcy // *Cell biology international*. – 2019. – V.43, №6. – P.582 – 592.
192. DeFreitas, M.J. Longitudinal patterns of urine biomarkers in infants across gestational ages / M.J. DeFreitas, W. Seeherunvong, Ch.P. Katsoufis [et al.] // *Pediatric Nephrology*. – 2016. – V.31, №7. – P.1179 – 1188.
193. Demir, F. Evaluation of the protective effect of edaravone on doxorubicin nephrotoxicity by [^{99m}Tc] DMSA renal scintigraphy and biochemical methods / F. Demir, M. Demir, H. Aygun // *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*. – 2020. – V.8, №393. – P.1383 – 1390.
194. Diamond, G.L. Understanding Renal Toxicity of Heavy Metals / G.L. Diamond, R.K. Zalups // *Toxicologic Pathology*. – 1998. – V.26, № 1. – P.92–103.

195. Diaz, J.H. Amatoxin-containing mushroom poisonings: species, toxidromes, treatments, and outcomes / J.H. Diaz // *Wilderness and Environmental Medicine*. – 2018. – V.29, №1. – P.111 – 118.
196. Dinda, A.K. Role of supravital staining of urine sediment and bright field microscopy in diagnosis of acute renal failure in bedside medicine / A.K. Dinda, C. Singh, S.C. Dash [et al.]// *The Journal of the Association of Physicians of India*. – 2000. – V.48, №10. – P.958 – 961.
197. Dinis-Oliveira, R.J. Human and experimental toxicology of orellanine / R.J. Dinis-Oliveira, M. Soares, C. Rocha-Pereira, F. Carvalho // *Hum. Exp. Toxicol.* – 2016. – V.9, № 35. – P.1016 – 1029.
198. Dittadi, R. Tissue polypeptide antigen as a putative indicator of apoptosis / R. Dittadi, D. Coradini, S. Meo [et al.] // *Clin. Chem.* – 1998. – V.9, №44. – P.2002 – 2003.
199. Djudjaj, S. Keratins are novel markers of renal epithelial cell injury / S. Djudjaj, M. Papisotiriou, R. D. Bülow [et al.] // *Kidney International*. – 2016. – V.89, № 4. – P.792 – 808.
200. Dobson, R.L.M. Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs / R.L.M. Dobson, S. Motlagh, M. Quijano [et al.] // *Toxicological Sciences*. – 2008. – V.106, № 1. – P.251 – 262.
201. Douros, A. Drug-induced kidney injury: a large case series from the berlin case-control surveillance study / A. Douros, E. Bronder, A. Klimpel [et al.] // *Clin. Nephrol.* – 2018. – V.1, №89. – P.18 – 26.
202. Downes, K.J. Acute kidney injury during treatment with intravenous acyclovir for suspected or confirmed neonatal herpes simplex virus infection / K.J. Downes, C.L.K. Boge, E. Baro [et al.] // *The Journal of Pediatrics*. – 2020. –V.219. – P.126 – 132.
203. Downes, K.J. Mechanisms of antimicrobial-induced nephrotoxicity in children / K.J. Downes, M. Hayes, J.C. Fitzgerald [et al.]// *Journal Antimicrob. Chemother.* – 2020. – V.1, №75. – P.1 – 13.
204. Du, W. Urinary NGAL for the diagnosis of the renal injury from multiple myeloma / W. Du, T. Shen, H. Li [et al.] // *Cancer Biomark.* – 2017. – V.1, № 18. – P.41 – 46.
205. Dubach, U.C. Use of urinary enzymes as markers of nephrotoxicity / U.C. Dubach, M. Le Hir, R. Gandhi // *Toxicol. Lett.* – 1989. V.46, №1–3. – P.193–196.
206. Duffield, J.S. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis / J.S. Duffield // *Journal Clin. Invest.* – 2014. – V.6, №6. – P.2299 – 306.
207. Ecke, T.H. Four tumour markers for urinary bladder cancer – tissue polypeptide antigen (TPA), HER-2/neu (ERB B2), urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) and TP53 mutation / T.H. Ecke, H.H. Schlechte, G. Schulze [et al.] // *Anticancer Res.* – 2005. – V.25, №1B. – P.635 - 641.

208. Edwards, J. A method for the evaluation of site-specific nephrotoxic injury in the intact rat kidney / J. Edwards, M. Kowal, A. VanDreel [et al.] // *Toxics*. – 2020. – V.1, №8. – 4.
209. Edwards, A. Cell volume regulation in the proximal tubule of rat kidney: proximal tubule cell volume regulation / A. Edwards, A.T. Layton // *Bull. Math. Biol.* – 2017. – V.11, №79. – P.2512 – 2533.
210. Engelhardt, J.A. Comparative renal toxicopathology of antisense oligonucleotides / J.A. Engelhardt // *Nucleic Acid Ther.* – 2016. – V.4, №26. P.199 – 209.
211. Ejnik, J.W. Determination of the isotopic composition of uranium in urine by inductively coupled plasma mass spectrometry / J.W. Ejnik, A.J. Carmichael, M.M. Hamilton [et al.] // *Health Phys.* – 2000. – V.2, №78. – P.143 – 146.
212. Ethier, J.H. The transtubular potassium concentration in patients with hypokalemia and hyperkalemia / J.H. Ethier, K.S. Kamel, P.O. Magner [et al.] // *Am. Journal Kidney Dis.* – 1990. – V.4, №15. – P.309 – 315.
213. Faarup, P. Structural evidence for counter-current flow in proximal tubules versus peritubular capillaries in the rat kidney. Evaluation of the counter-current mechanism between the proximal convoluted tubules and the peritubular capillaries in the rat nephron / P. Faarup, N.H. Holstein-Rathlou, V. Hegedüs // *APMIS*. – 2000. – V.11, №108. – P.779 – 784.
214. Fähling, M. Cyclosporin A induces renal episodic hypoxia / M. Fähling, S. Mathia, J. Scheidl [et al.] // *Acta Physiol (Oxf)*. – 2017. – V.3, №219. – P.625 – 639.
215. Faleiros, C.M. Effects of previous physical training on adriamycin nephropathy and its relationship with endothelial lesions and angiogenesis in the renal cortex / C. M. Faleiros, H. D. C. Francescato, M. Papoti [et al.] // *Life Sci*. – 2017. V.169. – P.43 – 51.
216. Fattah, H. Tubular Recovery after Acute Kidney Injury / H. Fattah, V. Vallon // *Nephron*. – 2018. – V.2, №140. – P.140 – 143.
217. Fayad, A.I. Timing of renal replacement therapy initiation for acute kidney injury / A.I. Fayad, D.G. Buamscha, A. Ciapponi // *Cochrane Database Syst Rev*. – 2018. – V.12. – CD010612.
218. Fazil Marickar, Y.M. Electrical conductivity and total dissolved solids in urine / Y.M. Fazil Marickar // *Urol. Res*. – 2010. – V.4, №38. – P.233 – 235.
219. Fent, K. Nephrotoxicity screening in rats: a validation study / K. Fent, E. Mayer, G. Zbinden // *Arch. Toxicol*. – 1988. – V.5, №61. – P.349 – 358.
220. Ferlizza, E. Validation of an electrophoretic method to detect albuminuria in cats / E. Ferlizza, F. Dondi, G. Andreani [et al.] // *Journal Feline Med. Surg*. – 2017. – V.8, №19. – P.860 – 868.
221. Fernández García, M.T. Aplicación práctica de métodos estereológicos renales en modelos animales experimentales / M.T. Fernández García, P.N. Martínez, V.G. de la Fuentea [et al.] // *Nefrologia*. – 2017– V.37. – P.29 – 33.

222. Foreman, J.W. Fanconi Syndrome / J.W. Foreman // *Pediatr. Clin. North Am.* – 2019. – V.1, №66. – P.159 – 167.
223. Fortier, A.M. Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation / A.M. Fortier, E. Asselin, M. Cadrin // *Journal Biol. Chem.* – 2013. – V.16, №288. – P.11555 – 11571.
224. Fowles, J. A toxicological review of the ethylene glycol series: Commonalities and differences in toxicity and modes of action / J. Fowles, M. Banton, J. Klapacz, H. Shen // *Toxicol. Lett.* – 2017. – V.278. – P.66 – 83.
225. Frazier, K.S. Kidney pathology and investigative nephrotoxicology strategies across species / K.S. Frazier, A.M. Ryan, R.A. Peterson, L.A. Obert // *Semin Nephrol.* – 2019. – V.2, №39. – P.190 – 201.
226. Frieske, I. Conventional and parametric kidney scintigrams – reproducibility of semiquantitative image evaluation / I. Frieske, E. Pietrzak-Stelmasiak, M. Bieńkiewicz [et al.] // *Nucl. Med. Rev. Cent. East Eur.* – 2008. V.1, №11. – P.22 – 25.
227. Fu, Y. Rodent models of AKI-CKD transition / Y. Fu, Ch. Tang, J. Cai [et al.] // *Am. Journal Physiol. Renal Physiol.* – 2018. –V.4, №315. – P.1098 – 1106.
228. Fuchs, T.C. Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity – an overview for applied toxicology / T.C. Fuchs, P. Hewitt // *AAPS Journal* – 2011. – V.4, №13. – P.615 – 631.
229. Fuchs, T.C. Evaluation of novel acute urinary rat kidney toxicity biomarker for subacute toxicity studies in preclinical trials / T.C. Fuchs, K. Frick, B. Emde [et al.] // *Toxicol Pathol.* – 2012. – V.40, №7. – P.1031 – 1048.
230. Fukuda, S. Clinical diagnostic indicators of renal and bone damage in rats intramuscularly injected with depleted uranium / S. Fukuda, M. Ikeda, M. Chiba, K. Kaneko // *Radiat Prot Dosimetry.* – 2006. – V.3, №118. – P.307 – 314.
231. Funes, S. A Quick Reference on High Anion Gap Metabolic Acidosis / S. Funes, H.A. de Morais // *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* –2017. – V.2, №47. – P.205 – 207.
232. Fusco, S. Medication-Induced Nephrotoxicity in Older Patients / S. Fusco, S. Garasto, A. Corsonello [et al.] // *Curr. Drug. Metab.* – 2016. – V.6, №17. – P.608 –625.
233. Gad, A.M. Renoprotective effects of montelukast in an experimental model of cisplatin nephrotoxicity in rats / A.M. Gad, O.M. Abd El-Raouf, B.M. El-Sayeh [et al.] // *Journal Biochem. Mol. Toxicol.* – 2017. –V.12, №31.
234. Gadalla, A.A.H. Identification of clinical and urine biomarkers for uncomplicated urinary tract infection using machine learning algorithms / A.A.H. Gadalla, I.M. Friberg, A. Kift-Morgan [et al.] // *Sci. Rep.* – 2019. – V.1, №9. – 19694.

235. Gaião, S.M. Biomarkers of renal recovery after acute kidney injury / S.M. Gaião, J.A.O.C. Paiva // *Rev. Bras. Ter Intensiva.* – 2017. – V.3, №29. – P.373 – 381.
236. Gan, Y. Protection of resveratrol on acute kidney injury in septic rats / Y. Gan, S. Tao, D. Cao [et al.] // *Hum Exp Toxicol.* – 2017. – V.10, №36. – P.1015 – 1022.
237. García-Pastor, C. Apoptosis and cell proliferation in proximal tubular cells exposed to apoptotic bodies. Novel pathophysiological implications in cisplatin-induced renal injury / C. García-Pastor, R. Blázquez-Serra, R.J. Bosch [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* – 2019. – V.9, № 1865. – P.2504 – 2515.
238. Gautier, J.C. Normal ranges and variability of novel urinary renal biomarkers in Sprague-Dawley Rats: comparison of constitutive values between males and females and across assay platforms / J.C. Gautier, T. Gury, M. Guffroy [et al.] // *Toxicol Pathol.* – 2014. – V.42, №7. – P.1092 – 1104.
239. Gaygısız, Ü. Can admission serum cystatin C level be an early marker subclinical acute kidney injury in critical care patients? *Scand J Clin Lab Invest* / Ü. Gaygısız, M. Aydoğdu, M. Badoğlu [et al.] // *Scand. Journal Clin. Lab. Invest.* – 2016. – V.2, № 76. – P.143 – 150.
240. Ge, Z. Gap junctional intercellular communication and endoplasmic reticulum stress regulate chronic cadmium exposure induced apoptosis in HK-2 cells / Z. Ge, H. Diao, X. Ji [et al.] // *Toxicol. Lett.* – 2018. – V.288. – P.35–43.
241. Gebremichael, Y. Multiscale mathematical model of drug-induced proximal tubule injury: linking urinary biomarkers to epithelial cell injury and renal dysfunction / Y. Gebremichael, J.Lu, H. Shankaran [et al.] // *Toxicol. Sci.* – 2018. – V.1, № 162. – P.200 – 211.
242. George, B. Profiling of kidney injury biomarkers in patients receiving cisplatin: time-dependent changes in the absence of clinical nephrotoxicity / B. George, X. Wen, N. Mercke [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2017. – V.4, №101. – P.510 – 518.
243. George, B. Urinary protein biomarkers of kidney injury in patients receiving cisplatin chemotherapy / B. George, M.S. Joy, L.M. Aleksunes // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* – 2018. – V.3, №243. – P.272 – 282.
244. George, B. Regulation of renal calbindin expression during cisplatin-induced kidney injury / B. George, J.T. Szilagyi, M.S. Joy, L.M. Aleksunes // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* – 2022. – 10:e23068.
245. George, B. Time-dependent changes in kidney injury biomarkers in patients receiving multiple cycles of cisplatin chemotherapy / B. George, X. Wen, N. Mercke [et al.] // *Toxicol. Rep.* – 2020. – V.7. – P.571 – 576.
246. Gerlach, C.V. Industry perspective on biomarker development and qualification / C.V. Gerlach, M. Derzi, S.K. Ramaiah, V.S. Vaidya // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2018. – V.1, № 103. – P.27 – 31.

247. Gewin, L.S. Renal fibrosis: Primacy of the proximal tubule / L.S. Gewin // *Matrix Biol.* – 2018. – V. 68–69. – P.248 – 262.
248. Gewin, L.S. Renal tubule repair: is wnt/ β -catenin a friend or foe? / L.S. Gewin // *Genes (Basel)*. – 2018. – V.2, № 9. – 58.
249. Gewin, L.S. Transforming growth factor- β in the acute kidney injury to chronic kidney disease transition / L.S. Gewin // *Nephron*. – 2019. – V.3, № 143. – P.154 – 157.
250. Ghliissi, Z. Evaluation of colistin nephrotoxicity administered at different doses in the rat model / Z. Ghliissi, A. Hakim, H. Mnif [et al.] // *Ren Fail.* – 2013. –V.8, № 35. – P.1130 – 1135.
251. Gibbs, A. Comparison of the specificity and sensitivity of traditional methods for assessment of nephrotoxicity in the rat with metabonomic and proteomic methodologies / A. Gibbs // *J. Appl. Toxicol.* – 2005. – V.4, № 25. – P.277 – 295.
252. Gil, H.W. Clinical implication of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and kidney injury molecule-1 in patients with acute paraquat intoxication / H.-W. Gil, J.-O. Yang, E.-Y. Lee, S.-Y. Hong // *Clin. Toxicol. (Phila)*. – 2009. – V.9, №47. – P.870 – 875.
253. Glas, A.S. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance / A.S. Glas, J.G. Lijmer, M.H. Prins [et al.] // *Journal Clin. Epidemiol.* – 2003. – V.11, № 56. – P.1129 –1135.
254. Goldstein, S.L. Medication-induced acute kidney injury / S.L. Goldstein // *Curr. Opin. Crit. Care*. – 2016. – V.6, № 22. – P.542 – 545.
255. Goldstein, S.L. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin rules out nephrotoxic acute kidney injury in children / S. Goldstein, K. A. Krallman, A. Schmerge [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2021. – V.7, № 36. – P.1915 – 1921.
256. Gong, L. Autophagy and inflammation regulation in acute kidney injury / L. Gong, Q. Pan, N. Yang // *Front Physiol.* – 2020. –V.11. – 576463.
257. Grauer, G.F. Proteinuria: measurement and interpretation / G.F. Grauer // *Top. Companion Anim. Med.* – 2011. – V.3, № 26. – P.121 – 127.
258. Greenberg, N. Specificity characteristics of 7 commercial creatinine measurement procedures by enzymatic and Jaffe method principles / N. Greenberg, W. L. Roberts, L. M. Bachmann [et al.] // *Clin. Chem.* – 2012. – V.2, № 58. – P.391 – 401.
259. Greenwood, S.L. The effect of loop diuretics on fluid reabsorption from the rat proximal convoluted tubule / S.L. Greenwood, S.J. White, R. Green // *Exp. Physiol.* – 1990. – V.3, № 75. – P.375 – 382.
260. Grgic, I. Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis / I. Grgic, G. Campanholle, V. Bijol [et al.] // *Kidney Int.* – 2012. – V.2, № 82. – P. 172 – 183.

261. Griffin, B.R. Biomarkers of drug-induced kidney toxicity / B.R. Griffin, S. Faubel, C.L. Edelstein // *Ther Drug Monit.* – 2019. – V.2, № 41. – P.213 – 226.
262. Grimm, P.C. Computerized image analysis of Sirius Red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function / P.C. Grimm, P. Nickerson, J. Gough [et al.] // *Journal Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – V.14. – P.1662 – 1668.
263. Grollman, A.P. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy / A.P. Grollman, S. Shibutani, M. Moriya [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – V.17, № 104 (29). – P.12129 – 12134.
264. Gueye, S. Chronic tubulointerstitial nephropathy induced by glucosamine: a case report and literature review / S. Gueye, M. Saint-Cricq, M. Coulibaly [et al.] // *Clin. Nephrol.* – 2016. – V.2, №86. – P.106 – 110.
265. Guler Simsek, G. Cytomorphological effects of mitomycin C on urothelial cells: eosinophils may be clue to the drug-induced changes / G. Guler Simsek, E. Vargol, H. Simsek // *Cell J.* – 2014. – V.3, № 16/ – P.375 – 376.
266. Gupta, S. Acute kidney injury and electrolyte abnormalities after chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy for diffuse large B-cell lymphoma / Sh. Gupta, H. Seethapathy, I.A. Strohhahn [et al.] // *Am. Journal Kidney Dis.* – 2020. – V.1, № 76. – P.63 – 71.
267. Guvercin, G. Matrix metalloproteinase-9, 10, and stress hyperglycaemia in acute kidney injury / G. Guvercin, V. Karakus, M. Aksit [et al.] // *Eur. Journal Clin. Invest.* – 2018. – V. 48. –12963.
268. Guzzi, F. Molecular mechanisms of the acute kidney injury to chronic kidney disease transition: an updated view / F. Guzzi, L. Cirillo, R.M. Roperto [et al.] // *Int. Journal Mol. Sci.* – 2019. – V.19, № 20. – 4941.
269. Haase, M. NGAL meta-analysis Investigator Group. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis / M. Haase, R. Bellomo, P. Devarajan [et al.] // *Am. Journal Kidney Dis.* – 2009. – V.6, № 54. – P.1012 – 1024.
270. Habibi, J. The combination of a neprilysin inhibitor (sacubitril) and angiotensin-II receptor blocker (valsartan) attenuates glomerular and tubular injury in the Zucker Obese rat / J. Habibi, A.R. Aroor, N. A. Das [et al.] // *Cardiovasc Diabetol.* – 2019. – V.1, № 18. – 40.
271. Hakeem, A. Cidofovir may be deleterious in BK virus-associated nephropathy / A. Hakeem, H. Sharma, A. Sharma // *Transplantation.* – 2011. – V.9, № 91. – P.11 – 12.
272. Hall, A.M. Drug-induced renal Fanconi syndrome / A.M. Hall, P. Bass, R.J. Unwin // *QJM.* – 2014. – V.4, № 107. – P. 261–269.

273. Hall, I.E. Risk of poor outcomes with novel and traditional biomarkers at clinical AKI diagnosis / I. E. Hall, S. G. Coca, M. A. Perazella [et al.] // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2011. – V. 12, № 6. – P.2740 – 2749.
274. Halperin, M.L. Potassium / M.L. Halperin, K.S. Kamel // *Lancet.* – 1998. – V.91222, № 352. – P.135 – 140.
275. Halperin, M.L. Mechanisms to concentrate the urine: an opinion / M.L. Halperin, K.S. Kamel, M.S. Oh // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* – 2008. – V.4, №17. – P.416 – 422.
276. Hao, Y. Differential protein expression in metallothionein protection from depleted uranium-induced nephrotoxicity / Y. Hao, J. Huang, C. Liu [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – V.6. – 38942.
277. Happé, H. Toxic tubular injury in kidneys from Pkd1-deletion mice accelerates cystogenesis accompanied by dysregulated planar cell polarity and canonical Wnt signaling pathways / H. Happé, W. N. Leonhard, A. van der Wal [et al.] // *Hum Mol Genet.* – 2009. – V14, № 18. – P.2532 – 2542.
278. Harauchi, T. A method for determining urinary enzyme activities as nephrotoxic indicators in rats / T. Harauchi, T. Yoshizaki // *Jpn. J. Pharmacol.* –1990. – V.2, № 54. – P.205 – 215.
279. Hashim, A.A. Cysteinyl leukotrienes predominantly mediate cisplatin-induced acute renal damage in male rats / A.A. Hashim, M.M. Helmy, S.M. Mouneir // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2018. – V.5, № 69.
280. Hayashi, S. Urinary yttrium excretion and effects of yttrium chloride on renal function in rats / S. Hayashi, K. Usuda, G. Mitsui [et al.] // *Biol. Trace. Elem. Res.* – 2006. – V. 1–3, № 114. – P.225 – 235.
281. Hazelhoff, M.H. Renal expression of organic anion transporters is modified after mercuric chloride exposure: Gender-related differences / M.H. Hazelhoff, R.P. Bulacio, A. Chevalier, A. M. Torres // *Toxicol Lett.* – 2018. – V.295. – P.390 – 396.
282. He, T. Peptides in plasma, urine, and dialysate: toward unravelling renal peptide handling / T. He, M. Pejchinovski, W. Mullen [et al.] // *Proteomics Clin. Appl.* – 2021. – V.1, №15. – e2000029.
283. Helmersson-Karlqvist, J. Urinary KIM-1, but not urinary cystatin C, should be corrected for urinary creatinine / J. Helmersson-Karlqvist, J. Ärnlov, A. C. Carlsson [et al.] // *Clin. Biochem.* – 2016. – V.15, № 49. – P.1164 – 1166.
284. Helmersson-Karlqvist, J. Day-to-day variation of urinary NGAL and rationale for creatinine correction / J. Helmersson-Karlqvist, J. Arnlov, A. Larsson // *Clin. Biochem.* – 2013. – V.1, № 46. – P.70 – 72.
285. Heyman, S.N. Acute kidney injury: lessons from experimental models / S.N. Heyman, C. Rosenberger, S. Rosen // *Contrib. Nephrol.* 2011. – V. 169. – P.286 –296.

286. Higgins, S.P. TGF- β 1/p53 signaling in renal fibrogenesis / S. P. Higgins, Y. Tang, C. E. Higgins [et al.] // *Cell Signal.* – 2018. – V.43. – P.1 – 10.
287. Hofmeister, R. Value of enzyme determinations in urine for the diagnosis of nephrotoxicity in rats / R. Hofmeister, A.S. Bhargava, P. Günzel // *Clin. Chim. Acta.* – 1986. – V.2, №160. – P.163 – 167.
288. Holditch, S.J. Recent advances in models, mechanisms, biomarkers, and interventions in cisplatin-induced acute kidney injury / S. J. Holditch, C. N. Brown, A. M. Lombardi [et al.] // *Int. Journal Mol. Sci.* – 2019. – V.12, №20. – 3011.
289. Holdt, B. An automated assay of urinary alanine aminopeptidase activity / B. Holdt, E. Peters, H.-R. Nagel [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2008. – V.4, №46. – P.537 – 540.
290. Holmdahl, J. Isolation and nephrotoxic studies of orellanine from the mushroom *Cortinarius speciosissimus* / J. Holmdahl, J. Ahlmén, S. Bergek [et al.] // *Toxicol.* – 1987. – V.2, №25. – P.195 – 199.
291. Holmdahl, J. Mushroom poisoning: *Cortinarius speciosissimus* nephrotoxicity / J. Holmdahl // *Goteborg: Univ. of Goteborg.* – 2001. – P.87–117.
292. Homma-Takeda, S. Uranium dynamics and developmental sensitivity in rat kidney / Sh. Homma-Takeda, T. Kokubo, Y. Terada [et al.] // *Journal Appl. Toxicol.* – 2013. – V.7, №33. – P.685 – 694.
293. Homma-Takeda, S. Cellular localization of uranium in the renal proximal tubules during acute renal uranium toxicity / S. Homma-Takeda, K. Kitahara, K. Suzuki [et al.] // *Journal Appl. Toxicol.* – 2015. – V.12, №35. – P.1594 – 600.
294. Homma-Takeda, S. Phosphorus localization and its involvement in the formation of concentrated uranium in the renal proximal tubules of rats exposed to uranyl acetate / S. Homma-Takeda, C. Numako, K. Kitahara [et al.] // *Int. Journal Mol. Sci.* – 2019. – V.19, №20. – 4677.
295. Hormia, M. Dolichos biflorus agglutinin (DBA) reacts selectively with mast cells in human connective tissues / M. Hormia, A.L. Kariniemi, L. Laitinen, & I. Virtanen // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1988. – V.36, №10. – P.1231 – 1237.
296. Horne, K.L. Three-year outcomes after acute kidney injury: results of a prospective parallel group cohort study / K. L. Horne, R. Packington, J. Monaghan [et al.] // *BMJ Open.* – 2017. – V.3, №7. – e015316.
297. Horowitz, B.Z. Amatoxin mushroom toxicity / B.Z. Horowitz, M.J. Moss // *StatPearls Publishing.* – 2021. – Bookshelf ID: NBK431052
298. Hosohata, K. Role of oxidative stress in drug-induced kidney injury / K. Hosohata // *Int. Journal Mol. Sci.* – 2016. – V.11, №17. – 1826.

299. Hosohata K., Ando H., Fujimura A. Urinary vanin-1 as a novel biomarker for early detection of drug-induced acute kidney injury / K. Hosohata, H. Ando, A. Fujimura // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2012. – V.3, №341. – P. 656 – 662.
300. Hottelart, C. Fenofibrate increases creatininemia by increasing metabolic production of creatinine / C. Hottelart, N. El Esper, F. Rose [et al.] // *Nephron.* – 2002. – V.3, №92. – P.536 – 541.
301. Huang, Q. Higher plasma AOPP is associated with increased proteinuria excretion and decreased glomerular filtration rate in pre-eclamptic women / Q.-T. Huang, M. Zhong, J.-W. Tian [et al.] // *Pregnancy Hypertens.* – 2013. – V.1, №3. – P.16 – 20.
302. Huang, L.L. P38 MAPK signaling pathway mediates advanced oxidation protein product-induced epithelial-to-mesenchymal transition in tubular cells / L.-L. Huang, X.-L. Zhu, W.-Q. Deng [et al.] // *Nan. Fang. Yi. Ke. Da. Xue. Xue. Bao.* – 2016. – V.36, №9. – P.1209 – 1214.
303. Huang, W.H. Colchicine overdose-induced acute renal failure and electrolyte imbalance / W.H. Huang, C.W. Hsu, C.C. Yu // *Ren. Fail.* – 2007. – V.3, №29. – P.367 – 370.
304. Huang, H. Gentamicin-induced acute kidney injury in an animal model involves programmed necrosis of the collecting duct / H. Huang, W.W. Jin, M. Huang [et al.] // *Journal Am. Soc. Nephrol.* – 2020. – V.9, №31. – P.2097 – 2115.
305. Huen, S.C. Macrophages in renal injury and repair / S.C. Huen, L.G. Cantley // *Annu Rev Physiol.* – 2017. – V.79. – P.449 – 469.
306. Huo, X. Protective effect of cilastatin against diclofenac-induced nephrotoxicity through interaction with diclofenac acyl glucuronide via organic anion transporters / X. Huo, Q. Meng, C. Wang [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2020. – V.9, №177. – P.1933 – 1948.
307. Iimaa, T. Analysis of sulfated glycosaminoglycans in ECM scaffolds for tissue engineering applications: modified alcian blue method development and validation / T. Iimaa, Y. Ikegami, R. Bual [et al.] // *Journal of Functional Biomaterials.* – 2019. – V.2, №10. – 19.
308. Ikeda, M. Changes in tubular dysfunction marker levels in parallel with the levels of copper, rather than cadmium, in urine of middle-aged women in non-polluted areas / M. Ikeda, F. Ohashi, Y. Fukui [et al.] // *Int. Arch. Occup. Environ Health.* – 2007. – V.3, №80. – P.171 – 183.
309. Ikeda, K. Comparison of dipstick and quantitative tests for proteinuria and hematuria in middle-aged, male Japanese employees: a single-center study / K. Ikeda, M. Abe, I. Masamoto [et al.] // *Health Sci. Rep.* – 2021. – V.2, №4. – 267.
310. Ilić, S. Morphometric analysis of structural renal alterations and beneficial effects of aminoguanidine in acute kidney injury induced by cisplatin in rats / S. Ilić, N. Stojiljković, D. Sokolović [et al.] // *Can. Journal Physiol. Pharmacol.* – 2020. – V.2, №98. – P.117 – 123.
311. Imafidon, E.C. Sexually dimorphic proteinuria in Wistar rats: relevance to clinical models / E.C. Imafidon, R.O. Akomolafe, A.A. Oladele // *Pathophysiology.* – 2016. – V.2, №23. – P.51 – 59.

312. Imran, S. Is specific gravity a good estimate of urine osmolality? / S. Imran, G. Eva, Sh. Christopher [et al.] // *Journal Clin. Lab. Anal.* – 2010. – V.6, №24. – P.426 – 430.
313. Inselmann, G. Enzymuria following amphotericin B application in the rat / G. Inselmann, M. Balaschke, H.T. Heidemann // *Mycoses.* – 2003. – V.5–6, №46. –P.169 – 173.
314. Ishitsuka, R. Impact of acute kidney injury defined by CTCAE v4.0 during first course of cisplatin-based chemotherapy on treatment outcomes in advanced urothelial cancer patients / R. Ishitsuka, J. Miyazaki, D. Ichioka [et al.] // *Clin. Exp. Nephrol.* – 2017. – V.4, №21. – P.732 – 740.
315. Iwakura, T. A high ratio of G1 to G0 phase cells and an accumulation of G1 phase cells before S phase progression after injurious stimuli in the proximal tubule / T. Iwakura, Y. Fujigaki, T. Fujikura [et al.] // *Physiol. Rep.* – 2014. – V.10, №2. – 12173.
316. Jiang, Y.S. Epithelial-mesenchymal transition of renal tubules: divergent processes of repairing in acute or chronic injury? / Y.S. Jiang, T. Jiang, B. Huang [et al.] // *Med. Hypotheses.* – 2013. – V.1, №81. – P.73 – 75.
317. Kang, H.M. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development / H. M. Kang, S.H. Ahn, P. Choi [et al.] // *Nat. Med.* – 2015. – V.1, №21. – P.37 – 46.
318. Kang, J.Y. Pharmacokinetics and renal toxicity of monomeric amphotericin B in rats after a multiple dose regimen / J. Yeon Kang, J. Gao, D.H. Shin [et al.] // *Pharm. Nanotechnol.* – 2016. – V.1, №4. – P.16 – 23.
319. Kari, J.A. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and serum cystatin C measurements for early diagnosis of acute kidney injury in children admitted to PICU / J.A. Kari, M.A. Shalaby, K. Sofyani [et al.] // *World Journal Pediatr.* – 2018. – V.2, №14. – P.134 – 142.
320. Kaucsár, T. Urine/plasma neutrophil gelatinase associated lipocalin ratio is a sensitive and specific marker of subclinical acute kidney injury in mice / T. Kaucsár, M. Godó, C. Révész [et al.] // *PLoS One.* – 2016. – V.1, №11. – e0148043.
321. Kellum, J.A. Definition and classification of acute kidney injury / J.A. Kellum, R. Bellomo, C. Ronco // *Nephron Clin. Pract.* – 2008. – V.4, №109. – P.182 –187.
322. Kessler, E. Urea reduction ratio and urea kinetic modeling: a mathematical analysis of changing dialysis parameters / E. Kessler, N.P. Ritchey, F. Castro [et al.] // *Am. Journal Nephrol.* – 1998. – V.6, №18. – P.471 –477.
323. Khalid, U. Kidney ischaemia reperfusion injury in the rat: the EGTI scoring system as a valid and reliable tool for histological assessment / U. Khalid, G. Pino-Chavez, P. Nesargikar [et al.] // *Journal Histol. Histopathol.* – 2016 – V.3, №1. – P.1 – 7.

324. Kida, Y. Endothelial sirtuin 1 inactivation enhances capillary rarefaction and fibrosis following kidney injury through Notch activation / Y. Kida, J.A. Zullo, M.S. Goligorsky // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2016. – V.3, №478. – P.1074–1079.
325. Kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) acute kidney injury Work Group. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury // *Kidney Int. Suppl.* – 2012. – V.2, № 1. – P. 1–126.
326. Kishi, S. Human reconstructed kidney models / S. Kishi, T. Matsumoto, T. Ichimura [et al.] // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* –2021. – V.2, №57. – P.133 –147.
327. Kitagawa, Y.F. Relationship between the refractive index and specific gravity of the rat urine (author's transl) / Y.F. Kitagawa, T. Takahashi, H. Hayashi // *Jikken Dobutsu.* – 1981. – V.3, №30. – P.307 – 311.
328. Kitahara, K. Uranium XAFS analysis of kidney from rats exposed to uranium / K. Kitahara, Ch. Numako, Y. Terada [et al.] // *J. Synchrotron. Radiat.* – 2017. – V.24 (Pt 2). – P.456 – 462.
329. Kitamura, Y. Urinary monitoring of exposure to yttrium, scandium, and europium in male Wistar rats / Y. Kitamura, K. Usuda, H. Shimizu [et al.] // *Biol. Trace. Elem. Res.* – 2012. – V.1–3, №150. – P.322 –327.
330. Klein, S.J. Oliguria in critically ill patients: a narrative review / S.J. Klein, G.F. Lehner, L.G. Forni [et al.] // *J. Nephrol.* – 2018. – V.6, №31. – P.855 –862.
331. Klopffleisch, R. Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology - a systematic review / R. Klopffleisch // *BMC Vet. Res.* – 2013. – № 9. – 123.
332. Kobayashi, T. The mechanism of renal stone formation and renal failure induced by administration of melamine and cyanuric acid / T. Kobayashi, A. Okada, Y. Fujii [et al.] // *Urol Res.* – 2010. – V.2, №38. – P.117 – 125.
333. Kocaoğlu, S. Study on the role of urine gamma-glutamyl transpeptidase activity during investigation of nephrotoxicity / S. Kocaoğlu, T. Berkan, A. Karan [et al.] // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* – 1994. – V.2, №42. – P.125 – 127.
334. Kocaoğlu, S. Acute acetaminophen nephrotoxicity and urinary gamma-glutamyl transferase activity in rats / S. Kocaoğlu, A. Karan, T. Berkan [et al.] // *Drug Metabol Drug Interact.* – 1997. – V.1, №14. – P.47 – 54.
335. Kocaoğlu, S. Urinary gamma-glutamyl transferase activity in rats with nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced nephrotoxicity / S. Kocaoğlu, A. Karan, T. Berkan [et al.] // *Arch. Immunol. Ther. Exp (Warsz).* – 1997. – V.1, №45. – P.73 – 77.
336. Koh, A.S. Identification of a mechanism by which the methylmercury antidotes N-acetylcysteine and dimercaptopropanesulfonate enhance urinary metal excretion: transport by the renal

organic anion transporter-1 / A.S. Koh, T.A. Simmons-Willis, J.B. Pritchard [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2002. – V.4, №62. – P.921 – 926.

337. Kohagura, K. An association between uric acid levels and renal arteriopathy in chronic kidney disease: a biopsy-based study / K. Kohagura, M. Kochi, T. Miyagi [et al.] // *Hypertens Res.* 2013. – V.1, №36. – P.43 – 49.

338. Koller, G.E. The presence of orellanine in spores and basidiocarp from *Cortinarius orellanus* and *Cortinarius rubellus* / G.E. Koller, K. Høiland, K. Janak [et al.] // *Mycologia.* – 2002. – V.5, №94. – P.752 – 756.

339. Konietzka, R. Gastrointestinal absorption of uranium compounds – a review / R. Konietzka // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* – 2015. – V.1, №71. – P.125 – 133.

340. Konigsfeld, H.P. Acute kidney injury in hospitalized patients who underwent percutaneous kidney biopsy for histological diagnosis of their renal disease / H.P. Konigsfeld, T.G. Viana, S.C. Pereira [et al.] // *BMC Nephrol.* – 2019. – V.1, №20. – 315.

341. Kosuda, L.L. Mercury-induced renal autoimmunity: changes in RT6+ T-lymphocytes of susceptible and resistant rats / L.L. Kosuda, D.L. Greiner, P.E. Bigazzi // *Environ Health Perspect.* – 1993. – V.101, №2. – P.178 – 185.

342. Kraut, J.A. Serum anion gap: its uses and limitations in clinical medicine / J.A. Kraut, N.E. Madias // *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007. – V.1, №2. – P.162 – 174.

343. Kraut, J.A. The serum anion gap in the evaluation of acid-base disorders: what are its limitations and can its effectiveness be improved? / J.A. Kraut, G.T. Nagami // *Clin. Journal Am. Soc. Nephrol.* – 2013. – V.11, №8. – P.2018 – 2024.

344. Kumar, S. Defining the acute kidney injury and repair transcriptome / S. Kumar, J. Liu, A.P. McMahon // *Semin. Nephrol.* – 2014. – V.4, №34. – P.404 – 417.

345. Kumar, S. Cellular and molecular pathways of renal repair after acute kidney injury / S. Kumar // *Kidney Int.* – 2018. – V.1, №93 – P.27 – 40.

346. Kurien, B.T. Experimental animal urine collection: a review / B.T. Kurien, N.E. Everds, R.H. Scofield // *Lab. Anim.* – 2004. – V.4, №38. – P.333 – 361.

347. Kürnsteiner, H. Isolation of a lethal toxin from *Cortinarius orellanus* Fr. / H. Kürnsteiner, M. Moser // *Mycopathologia.* – 1981. – V.2, №74. – P.65 – 72.

348. Kustán, P. Urinary orosomucoid: validation of an automated immune turbidimetric test and its possible clinical use / P. Kustán, B. Szirmay, Z. Horváth-Szalai [et al.] // *Biochem. Med (Zagreb).* – 2016. – V.3, №26. – P.421 – 430.

349. Kuster, N. Enzymatic creatinine assays allow estimation of glomerular filtration rate in stages 1 and 2 chronic kidney disease using CKD-EPI equation / N. Kuster, J.-P. Cristol, E. Cavalier [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2014. – №428. – P.89 – 95.

350. Kwiatkowska, E. Gamma-glutamyl transpeptidase as the marker of kidney graft function / E. Kwiatkowska, L. Domański, J. Bober [et al.] // *Adv. Clin. Exp. Med.* – 2014. – V.6, №23. – P.947 – 952.
351. Kwiatkowska, E. N-acetyl-beta-glucosaminidase urine activity as a marker of early proximal tubule damage and a predictor of the long-term function of the transplanted kidneys / E. Kwiatkowska, L. Domański, J. Bober [et al.] // *Acta. Biochim. Pol.* – 2014. – V.2, №61. – P.275 – 280.
352. Kwon, S.H. Subtle change of cystatin C, with or without acute kidney injury, associated with increased mortality in the intensive care unit / S. Hyo Kwon, J. Hyun, J. S. Jeon [et al.] // *J. Crit. Care.* – 2011. – V.2, №26. – P.566 – 571.
353. Lamb, E.J. How should proteinuria be detected and measured? / E.J. Lamb, F. MacKenzie, P.E. Stevens // *Ann. Clin. Biochem.* – 2009. – №46 (Pt 3). – P.205 – 217.
354. Lameire, N. Uremic toxins and peritoneal dialysis / N. Lameire, R. Vanholder, R. De Smet // *Kidney Int Suppl.* – 2001. – №78. – P.292 – 297.
355. Lan, R. PTEN loss defines a TGF- β -induced tubule phenotype of failed differentiation and JNK signaling during renal fibrosis / R. Lan, H. Geng, A.J. Polichnowski [et al.] // *Am. Journal Physiol. Renal Physiol.* – 2012. – V.9, №302. – P.1210–1223.
356. Landau, D. Potassium-related inherited tubulopathies / D. Landau // *Cell. Mol. Life. Sci.* – 2006. – V.17, №63. – P.1962 – 1968.
357. Landry, G.M. Diethylene glycol-induced toxicities show marked threshold dose response in rats / G.M. Landry, C.L. Dunning, F. Abreo [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2015. – V.3, №282. – P.244 – 251.
358. Langford, C.A. Vasculitis / C.A. Langford // *Journal Allergy. Clin. Immunol.* – 2010. – №125 (2 Suppl 2). – P.216 – 225.
359. Lareu, R.R. Essential modification of the Sircol Collagen Assay for the accurate quantification of collagen content in complex protein solutions / R.R. Lareu, D.I. Zeugolis, M. Abu-Rub [et al.] // *Acta Biomaterialia.* – 2010. – V. 6, №8. – P.3146 – 3151
360. Lau, L. Serum cystatin C for acute kidney injury evaluation in children treated with aminoglycosides / L. Lau, Z. Al-Ismaili, M. Harel-Sterling [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2017. – V.1, №32. – P.163 – 171.
361. Lawson, J.S. Urinary active transforming growth factor β in feline chronic kidney disease / J. S. Lawson, H.M. Syme, C.P. D.Wheeler-Jones [et al.] // *Vet Journal.* – 2016. – №214. – P.1 – 6.
362. Le Dudal, M. Stiripentol protects against calcium oxalate nephrolithiasis and ethylene glycol poisoning / M. Le Dudal, L. Huguet, J. Perez [et al.] // *Journal Clin. Invest.* – 2019. – V.6, №129. – P.2571 – 2577.

363. Lee, S.H. The anion gap is a predictive clinical marker for death in patients with acute pesticide intoxication / S.-H. Lee, S. Park, J.-W. Lee [et al.] // *Journal Korean Med Sci.* – 2016. – V.7, №31. – P.1150 – 1159.
364. Lendrum, A.C. Studies on the character and staining of fibrin / A.C. Lendrum, D.S. Fraser, W. Slidders [et al.] // *Journal Clin. Pathol.* –1962. – V.5, №15. – P.401 – 413.
365. Lendrum, A. Further observations on the age changes in extravascular fibrin / A. Lendrum, D.S. Fraser, W. Slidders // *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde.* – 1964. – №108. – 2373.
366. Leung, E.M. Noninvasive measurement of aristolochic acid-DNA adducts in urine samples from aristolochic acid-treated rats by liquid chromatography coupled tandem mass spectrometry: evidence for DNA repair by nucleotide-excision repair mechanisms / E.M. Leung, W. Chan // *Mutat Res.* – 2014. – №766-767. – P.1 – 6.
367. Li, Z. Circulating kidney injury molecule-1 is a novel diagnostic biomarker for renal dysfunction during long-term adefovir therapy in chronic hepatitis B / Z. Li, C. Shen, Y. Wang [et al.] // *Medicine (Baltimore).* – 2016. – V.44, №95. – 5264.
368. Li, J. Ferroptosis: past, present and future / J. Li, F. Cao, H.-L. Yin [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2020. – V.2, №11. – 88.
369. Li, Z. 3D culture supports long-term expansion of mouse and human nephrogenic progenitors / Z. Li, T. Araoka, J. Wu [et al.] // *Cell Stem Cell.* – 2016. – V.4, №19. – P.516 – 529.
370. Li Z., Araoka T., Belmonte J.C.I. Gene editing in 3D cultured nephron progenitor cell lines / Z. Li, T. Araoka, J.C.I. Belmonte // *Methods Mol. Biol.* – 2019. – №1926. – P.151 – 159.
371. Liang, X. Advanced oxidation protein products as prognostic biomarkers for recovery from acute kidney injury after coronary artery bypass grafting / X. Liang, Y. Chen, J. Zhuang [et al.] // *Biomarkers.* – 2012. – V.6, №17. – P.507 – 512.
372. Liang, J. Measurement of urinary matrix metalloproteinase-7 for early diagnosis of acute kidney injury based on an ultrasensitive immunomagnetic microparticle-based time-resolved fluoroimmunoassay / J. Liang, G. Lin, J. Tian [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2019. – №490. – P.55 – 62.
373. Liang, K.V. Urea reduction ratio may be a simpler approach for measurement of adequacy of intermittent hemodialysis in acute kidney injury / K.V. Liang, J.H. Zhang, P.M. Palevsky // *BMC Nephrol.* – 2019. – V.1, №20. – 82.
374. Lim, H. Effects of flavonoids on senescence-associated secretory phenotype formation from bleomycin-induced senescence in BJ fibroblasts / H. Lim, H. Park, H.P. Kim // *Biochem Pharmacol.* – 2015. – V. 96, №4. – P.337 – 348.
375. Lin, X. Urine interleukin-18 in prediction of acute kidney injury: a systemic review and meta-analysis / X. Lin, J. Yuan, Y. Zhao [et al.] // *Journal Nephrol.* – 2015. – V.1, №28. – P.7 – 16.

376. Lin S.L. Targeting endothelium-pericyte cross talk by inhibiting VEGF receptor signaling attenuates kidney microvascular rarefaction and fibrosis / S.-L. Lin, F.-C. Chang, C. Schrimpf [et al.] // *Am. Journal Pathol.* – 2011. – V.2, №178. – P.911 – 923.
377. Linkermann, A. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis / A. Linkermann, R. Skouta, N. Himmerkus [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2014. – V.47, №111. – P.16836 – 16841.
378. Lipphardt, M. Endothelial dysfunction is a superinducer of syndecan-4: fibrogenic role of its ectodomain / M. Lipphardt, J.W. Song, B.B. Ratliff [et al.] // *Am. Journal Physiol. Heart Circ. Physiol.* –2018. – V.3, №314. – P.484 – 496.
379. Lipphardt, M. The third path of tubulointerstitial fibrosis: aberrant endothelial secretome / M. Lipphardt, J.W. Song, K. Matsumoto [et al.] // *Kidney Int.* – 2017. – V.3, №92. – P.558 – 568.
380. Lipphardt, M. Dickkopf-3 in aberrant endothelial secretome triggers renal fibroblast activation and endothelial-mesenchymal transition / M. Lipphardt, H. Dihazi, N. L. Jeon [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2019. – V.1, №34. – P.49 – 62.
381. Lippi, I. Clinical utility of urine kidney injury molecule-1 (KIM-1) and gamma-glutamyl transferase (GGT) in the diagnosis of canine acute kidney injury / I. Lippi, F. Perondi, V. Meucci [et al.] // *Vet. Res. Commun.* – 2018. – V.42. – P.95 – 100.
382. Lis-Sochocka, M. Histomorphometry of nuclei of proximal convoluted tubules epithelium of kidney of experimental animals after Cladribine (2-CdA) administration / M. Lis-Sochocka, K. Czerny // *Ann. Univ. Mariae Curie Sklodowska Med.* – 2004. – V.1, №59. – P.118 – 123.
383. Lis-Sochocka, M. Ultrastructure of kidney renal proximal convoluted tubules of experimental animals after Cladribine (2-CdA) administration / M. Lis-Sochocka, M. Lańcut, K. Czerny // *Ann. Univ. Mariae Curie Sklodowska Med.* –2004. – V.1, №59. – P.157 – 162.
384. Little, M.H. Understanding kidney morphogenesis to guide renal tissue regeneration / M.H. Little, A.N. Combes, M. Takasato // *Nat. Rev. Nephrol.* – 2016. – V.10, №12. – P.624 – 635.
385. Liu, B.C. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease / B.-C. Liu, T.-T. Tang, L.-L. Lv [et al.] // *Kidney Int.* –2018. – V.3, №93. – P.568 – 579.
386. Liu, L. Peritoneal dialysis for acute kidney injury / L. Liu, L. Zhang, G.J. Liu, P. Fu // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2017. – V.12, №12. – CD011457.
387. Livero, F.A. Cellular and molecular mechanisms of diuretic plants: an overview / F.A. Livero, J.V. Menetrier, E.L. Botelho Lourenco [et al.] // *Curr Pharm Des.* – 2017. – V.8, №23. – P.1247 – 1252.
388. Lohrmann, E. Tubular effects of the diuretic torasemide / E. Lohrmann, I. Burhoff, R. Greger // *Cardiology.* – 1994. – V.84, №2. – P.135 – 142.

389. Lu, M. GSK3 β -mediated Keap1-independent regulation of Nrf2 antioxidant response: a molecular rheostat of acute kidney injury to chronic kidney disease transition / M. Lu, P. Wang, Y. Qiao [et al.] // *Redox Biol.* – 2019. – V.26. – 101275.
390. Lucas, G.N.C. Pathophysiological aspects of nephropathy caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs / G.N.C. Lucas, A.C.C. Leitão, R.L. Alencar [et al.] // *Journal Bras. Nefrol.* – 2019. – V.1, №41. – P.124 – 130.
391. Luo, T. Treatment of cadmium-induced renal oxidative damage in rats by administration of alpha-lipoic acid / T. Luo, G. Liu, M. Long [et al.] // *Environ. Sci. Pollut. Res Int.* – 2017. – V.2, №24. – P.1832 – 1844.
392. Luo, Q.H. Evaluation of KIM-1 and NGAL as early indicators for assessment of gentamycin-induced nephrotoxicity in vivo and in vitro / Q.-H. Luo, M.-L. Chen, Z.-L. Chen [et al.] // *Kidney Blood Press Res.* – 2016. – V.6, №41. – P.911 – 918.
393. Luo, C. Wnt9a promotes renal fibrosis by accelerating cellular senescence in tubular epithelial cells / C. Luo, S. Zhou, Z. Zhou [et al.] // *Journal Am. Soc. Nephrol.* – 2018. – V.4, №29. – P.1238 – 1256.
394. Lyon, S.D. Comparison of urine dipstick, sulfosalicylic acid, urine protein-to-creatinine ratio, and species-specific ELISA methods for detection of albumin in urine samples of cats and dogs / S.D. Lyon, M.W. Sanderson, S.L. Vaden [et al.] // *Journal Am. Vet. Med. Assoc.* – 2010. – V.8, №236. – P.874 – 879.
395. Maeda, H. Significance of postmortem biochemistry in determining the cause of death / H. Maeda B.-L. Zhu, T. Ishikawa [et al.] // *Leg. Med. (Tokyo).* – 2009. – V.11, №1. – P.46 – 49.
396. Maeda, H. Forensic molecular pathology of violent deaths / H. Maeda, B.-L. Zhu, T. Ishikawa [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2010. – V.1–3, №203. – P.83–92.
397. Magalhães, P. Comparison of urine and plasma peptidome indicates selectivity in renal peptide handling / P. Magalhães, C. Pontillo, M. Pejchinovski [et al.] // *Proteomics Clin Appl.* – 2018. – V.5, №12. – e1700163.
398. Malir, F. Ochratoxin A: 50 years of research / F. Malir, V. Ostry, A. Pfohl-Leszkowicz [et al.] // *Toxins (Basel).* – 2016. – V.7, №8. – P.191.
399. Manohar, S. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature / S. Manohar, N. Leung // *Journal Nephrol.* – 2018. – V.1, №31. – P.15 – 25.
400. Marcano, M. Maximum urine concentrating capability in a mathematical model of the inner medulla of the rat kidney / M. Marcano, A.T. Layton, H.E. Layton // *Bull Math Biol.* – 2010. – V.2, №72. – P.314 – 339.
401. Marotta M., Martino G. Sensitive spectrophotometric method for the quantitative estimation of collagen // *Anal Biochem.* 1985. – V.150. – P.86 – 90.

402. Mårtensson, J. Novel biomarkers of acute kidney injury and failure: clinical applicability / J. Mårtensson, C.R. Martling, M. Bell // *Br. Journal Anaesth.* – 2012. – V.6, №109. – P.843 – 850.
403. Martin-Sanchez, D. Ferroptosis, but not necroptosis, is important in nephrotoxic folic acid-induced AKI / D. Martin-Sanchez, O. Ruiz-Andres, J. Poveda [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2017. – V.1, №28. – P.218 –229.
404. Martines, M.S. Effects of Schizolobium parahyba extract on experimental Bothrops venom-induced acute kidney injury / M.S. Martines, M.M. Mendes, M.H.M. Shimizu [et al.] // *PLoS.* – 2014. – V.2, №9. – e86828.
405. McDiarmid, M.A. Biological monitoring and surveillance results of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium / M.A. McDiarmid, S.M. Engelhardt, M. Oliver [et al.] // *Int .Arch. Occup. Environ Health.* – 2006. – V.1, №79. – P.11 – 21.
406. McDuffie, J.E. Acute biomarker panel changes associated with amphotericin B nephrotoxicity in female Sprague-Dawley rats / J.E. McDuffie, S. Lee, J.Y. Ma [et al.] // *J. Toxicol. Sci.* – 2016. – V.4, №41. – P.459 – 468.
407. McDuffie, J.E. Immunolocalization of novel corticomedullary tubule injury markers in Cynomolgus monkeys treated with amphotericin B / J.E. McDuffie, J.Y. Ma, Y. Zhang [et al.] // *Journal Toxicol. Sci.* – 2017. – V.2, №42. – P.167 – 174.
408. McMahan, T.F. Comparative acute nephrotoxicity of salicylic acid, 2,3-dihydroxybenzoic acid, and 2,5-dihydroxybenzoic acid in young and middle aged Fischer 344 rats / T.F. McMahan, S.A. Stefanski, R.E. Wilson [et al.] // *Toxicology.* – 1991. – V.3, №66. – P.297–311.
409. McMartin, K. Antidotes for poisoning by alcohols that form toxic metabolites / K. McMartin, Jacobsen, K.E. Hovda // *Br. Journal Clin. Pharmacol.* – 2016. – V.3, №81. – P.505 – 515.
410. Medić, B. Evaluation of novel biomarkers of acute kidney injury: the possibilities and limitations / B. Medić, B. Rovcanin, K.S. Vujovic [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2016. – V.19, №23. – P.1981 – 1997.
411. Mehendale H.M. *Comprehensive toxicology (second Edition). 7.19 - Halogenated hydrocarbons* / B. Medić; editor C. A. MCQUEEN. – Elsevier, 2010. – P.459 – 474.
412. Meng, X.M. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis / X.-M. Meng, P. M.-K. Tang, J. Li [et al.] // *Front. Physiol.* – 2015. – №6. – P.82.
413. Mercado, M.G. *Acute Kidney Injury: Diagnosis and Management* / M.G. Mercado, D.K. Smith, E.L. Guard // *Am. Fam. Physician.* – 2019. – V.11, №100. – P.687 – 694.
414. Mertoglu, C. Myo-inositol oxygenase as a novel marker in the diagnosis of acute kidney injury / C. Mertoglu, M. Gunay, A. Gurel [et al.] // *Journal of Medical Biochemistry.* – 2018. – V.1, №37. – P.1 – 6.

415. Mesquita, M. Effects of zinc against mercury toxicity in female rats 12 and 48 hours after HgCl₂ exposure / M. Mesquita, T.F. Pedroso, C.S. Oliveira [et al.] // *EXCLI J.* – 2016. – №15. – P.256–267.
416. *Methods in renal toxicology* / edited by Rudolfs K. Zalups and Lawrence H. Lash. 1996 by CRC Press, Inc. – 435 p.
417. Miller, D.S. Fluorescence imaging study of organic anion transport from renal proximal tubule cell to lumen / D.S. Miller, S. Letcher, D.M. Barnes // *Am. Journal Physiol.* – 1996. – №271 (3 Pt 2). – P.508 – 520.
418. Min, H.S. Renoprotective effects of a highly selective A₃ adenosine receptor antagonist in a mouse model of adriamycin-induced nephropathy / H.S. Min, J.J. Cha, K. Kim [et al.] // *Journal Korean Med. Sci.* – 2016. – V.9, №31. – P.1403 – 1412.
419. Minton, D.M. Agreement of urine specific gravity measurements between manual and digital refractometers / D.M. Minton, E.K. O'Neal, T.M. Torres-McGehee // *Journal Athl. Train.* – 2015. – V.1, №50. – P.59 – 64.
420. Miri, S. Sex difference in gentamicin-induced nephrotoxicity: influence of l-arginine in rat model / S. Miri, T. Safari, G.R. Komeili [et al.] // *Int. Journal Prev. Med.* – 2018. – №9. – 108.
421. Miyata, T. Reactive carbonyl compounds as uremic toxins / T. Miyata, A.A. Akhand, K. Kurokawa [et al.] // *Contrib Nephrol.* – 2001. – №133. – P.71 – 80.
422. Mizuno, S. Association of HSP73 with the acquired resistance to uranyl acetate-induced acute renal failure / S. Mizuno, K. Fujita, R. Furuy [et al.] // *Toxicology.* – 1997. – V.2-3, №117. – P.183 – 191.
423. Mohamed, F. Role of biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury in deliberate poisoning and envenomation in less developed countries / F. Mohamed, Z.H. Endre, N.A. Buckley // *Br. Journal Clin. Pharmacol.* – 2015. – V.1, №80. – P.3 – 19.
424. Molitoris, B.A. Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/endothelial axis / B.A. Molitoris // *Journal Clin. Invest.* – 2014. – V.6, №124. – P.2355 – 2363.
425. Moll, R. The human keratins: biology and pathology / R. Moll, M. Divo, L. Langbein // *Histochem Cell Biol.* – 2008. – V.6, №129. – P.705 – 733.
426. Moriguchi, J. Comparative evaluation of four urinary tubular dysfunction markers, with special references to the effects of aging and correction for creatinine concentration / J. Moriguchi, T. Ezaki, T. Tsukahara [et al.] // *Toxicol Lett.* – 2003. – V.3, №143. – P.279 – 290.
427. Mossoba, M.E. Comparison of diglycolic acid exposure to human proximal tubule cells in vitro and rat kidneys in vivo / M.E. Mossoba, S. Vohra, H. Toomer [et al.] // *Toxicol Rep.* – 2017. – V.4. – P.342 – 347.

428. Mostert, M. Starvation Ketoacidosis as a Cause of Unexplained Metabolic Acidosis in the Perioperative Period / M. Mostert, A. Bonavia // *Am. Journal Case Rep.* – 2016. – V.17. – P.755 – 758.
429. Motohashi H., Inui K. Organic cation transporter OCTs (SLC22) and MATEs (SLC47) in the human kidney / H. Motohashi, K. Inui // *AAPS J.* – 2013. – V.2, №15. – P.581 – 588.
430. Mourad, B.H. Demonstration of subclinical early nephrotoxicity induced by occupational exposure to silica among workers in pottery industry / B.H. Mourad, Y.A. Ashour // *Int. Journal Occup. Environ. Med.* – 2020. – V.2, №11. – P.85 – 94.
431. Movahed, A. Serological, pathological, and scintigraphic assessment of *Hemiscorpius lepturus* effects on renal dysfunction in rats / A. Movahed, H. Fatemikia, K. Tanha [et al.] // *Iran Journal Basic. Med. Sci.* – 2018. – V.12, №21. – P.1221 – 1225.
432. Muller, D. Role of the sodium-dependent phosphate co-transporters and of the phosphate complexes of uranyl in the cytotoxicity of uranium in LLC-PK1 cells / D. Muller, P. Houpert, J. Cambar [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2006. – V.2, №214. – P.166 – 177.
433. Muller, D.S. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporters and absorptive endocytosis in the uptake of low concentrations of uranium and its toxicity at higher concentrations in LLC-PK1 cells / D.S. Muller, P. Houpert, J. Cambar [et al.] // *Toxicol Sci.* – 2008. – V.2, №101. – P.254 – 262.
434. Munshi, R. MCP-1 gene activation marks acute kidney injury / R. Munshi, A. Johnson, E. D Siew [et al.] // *Journal Am. Soc. Nephrol.* – 2011. – V.1, №22. – P.165 – 175.
435. Muriithi, A.K. Biopsy-proven acute interstitial nephritis, 1993-2011: a case series / A.K. Muriithi, N. Leung, A.M. Valeri [et al.] // *Am. J. Kidney Dis.* – 2014. – V.4, №64. – P.558 – 566.
436. Naghibi, B. Vancomycin-induced nephrotoxicity in rats: is enzyme elevation a consistent finding in tubular injury? / B. Naghibi, T. Ghafghazi, V. Hajhashemi [et al.] // *Journal Nephrol.* – 2007. – V.4, №20. – P.482 – 488.
437. Najar, D. Pharmacokinetic properties of the nephrotoxin orellanine in rats / D. Najar, B. Haraldsson, A. Thorsell [et al.] // *Toxins.* – 2018. – V.8, № 10. – 333.
438. Naruse, M. Usefulness of the quantitative measurement of urine protein at a community-based health checkup: a cross-sectional study / M. Naruse, M. Mukoyama, J. Morinaga [et al.] // *Clin. Exp. Nephrol.* – 2020. – V.1, №24. – P.45 – 52.
439. Nast, C.C. Medication-Induced Interstitial Nephritis in the 21st Century / C.C. Nast // *Adv. Chronic. Kidney Dis.* – 2017. – V.2, № 24. – P.72 – 79.
440. Nawata, C.M. Mammalian urine concentration: a review of renal medullary architecture and membrane transporters / C.M. Nawata, T.L. Pannabecker // *Journal Comp. Physiol B.* – 2018. – V.6, №188. – P.899 – 918.

441. Nemmar, A. Potentiation of cisplatin-induced nephrotoxicity by repeated exposure to diesel exhaust particles: An experimental study in rats / A. Nemmar, S. Beegam, P. Yuvaraju [et al.] // *Exp. Bio. Med.* (Maywood). – 2014. – V.8, №239. – P.1036 – 1044.
442. Nepovimova, E. The history of poisoning: from ancient times until modern ERA / E. Nepovimova, K. Kuca // *Arch. Toxicol.* – 2019. – №93. – P. 11 – 24.
443. Nephrotox: data base for chemicals, drugs, poisons and other related medical interventions. 2021 Basys Data. Available at: <http://www.nephrotox.com/index.php>
444. Nielsen, P.M. In situ lactate dehydrogenase activity: a novel renal cortical imaging biomarker of tubular injury? / P.M. Nielsen, C. Laustsen, L.B. Bertelsen [et al.] // *Am. Journal Physiol. Renal Physiol.* – 2017. – V.3, №312. – P.465 – 473.
445. Nivy, R. Utility of urinary alkaline phosphatase and γ -glutamyl transpeptidase in diagnosing acute kidney injury in dogs / R. Nivy, Y. Avital, I. Aroch [et al.] // *Vet. Journal* – 2017. – №220. – P.43 – 47.
446. Norden, A.G. Urine retinol-binding protein 4: a functional biomarker of the proximal renal tubule / A.G. Norden, M. Lapsley, R.J. Unwin // *Adv. Clin. Chem.* – 2014. – №63. – P.85 – 122.
447. Nortier, J.L. Proximal tubular injury in Chinese herbs nephropathy: monitoring by neutral endopeptidase enzymuria / J.L. Nortier, M.M. Deschodt-Lanckman, S. Simon [et al.] // *Kidney Int.* – 1997. – V.1, №51. – P.288 – 293.
448. O'Donnell, J.N. Dose, duration, and animal sex predict vancomycin-associated acute kidney injury in preclinical studies / J. N. O'Donnell, N.J. Rhodes, C.M. Miglis [et al.] // *Int. J. Antimicrob Agents.* – 2018. – V.2, №51. – P.239 – 243.
449. O'Reilly, V.P. Urinary soluble CD163 in active renal vasculitis / V.P. O'Reilly, L. Wong, C. Kennedy [et al.] // *Journal Am. Soc. Nephrol.* – 2016. – V.9, №27. – P.2906 – 2916.
450. Oguz, O. Is automated kinetic measurement superior to end-point for advanced oxidation protein product? / O. Oguz, B.B. Inal, T. Emre [et al.] // *Clin Lab.* – 2014. – V.6, №60. – P.925 – 930.
451. Ohba, H. Effects of acetaminophen on mitochondrial complex I activity in the rat liver and kidney: a PET study with ^{18}F -BCPP-BF / H. Ohba, M. Kanazawa, T. Kakiuchi [et al.] // *EJNMMI.* – 2016. – V. 6. - 82.
452. Ohnishi, K. Distribution, elimination, and renal effects of single oral doses of europium in rats / K. Ohnishi, K. Usuda, S. Nakayama [et al.] // *Biol. Trace. Elem. Res.* – 2011. – V.2, №143. – P.1054 – 1063.
453. Ohmachi, Y. Sodium bicarbonate protects uranium-induced acute nephrotoxicity through uranium-decorporation by urinary alkalinization in rats / Y. Ohmachi, T. Imamura, M. Ikeda [et al.] // *J. Toxicol. Pathol.* – 2015. – V.2, №28. – P.65 – 71.

454. Okaneku, J. Urine uranium concentrations and renal function in residents of the United States–2001 to 2010 / J. Okaneku, D. Vearrier, R. McKeever [et al.] // *Clin Toxicol (Phila)*. – 2015. – V.10, №53. – P.931 – 934.
455. Oladipo, O.O. Evaluation of hepatorenal impairments in Wistar rats coexposed to low-dose lead, cadmium and manganese: insights into oxidative stress mechanism / O.O. Oladipo, J.O. Ayo, S.F. Ambali [et al.] // *Toxicol Mech Methods*. – 2016. – V.9, №26. – P.674 – 684.
456. Oliveira, V.A. Acute mercury exposition of virgin, pregnant, and lactating rats: histopathological kidney and liver evaluations / V.A. Oliveira, G. Favero, A. Stacchiotti [et al.] // *Environ. Toxicol.* – 2017. – V.5, №32. – P.1500 – 1512.
457. Omotoso, B.A. Acute kidney injury (AKI) outcome, a predictor of long-term major adverse cardiovascular events (MACE) / B.A. Omotoso, E.M. Abdel-Rahman, W. Xin [et al.] // *Clin Nephrol.* – 2016. – V.1, №85. – P.1 – 11.
458. Ornellas, F.M. Mesenchymal Stromal Cells Induce Podocyte Protection in the Puromycin Injury Model / F.M. Ornellas, R.J. Ramalho, C. Fanelli [et al.] // *Sci Rep.* – 2019. – V.9. – 19604.
459. Ostermann, M. Fluid overload and acute kidney injury: cause or consequence? / M. Ostermann, H.M. Straaten, L.G. Forni // *Crit. Care.* – 2015. – №19. – 443.
460. Ostermann, M. Recommendations on acute kidney injury biomarkers from the acute disease quality initiative consensus conference: a consensus statement / M. Ostermann, A. Zarbock, S. Goldstein [et al.] // *JAMA Netw. Open.* – 2020. – V.10, №3. – e2019209.
461. Oyaert, M. Renal tubular epithelial cells add value in the diagnosis of upper urinary tract pathology / M. Oyaert, M. Speeckaert, J. Boelens [et al.] // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. – 2020. – V.58, №4. – P.597 – 604.
462. Pais, G.M. Vancomycin-induced kidney injury: animal models of toxicodynamics, mechanisms of injury, human translation, and potential strategies for prevention / G.M. Pais, J. Liu, S. Zepcan [et al.] // *Pharmacotherapy.* – 2020. – V.5, №40. – P.438 – 454.
463. Palant, C.E. Long-term consequences of acute kidney injury in the perioperative setting / C.E. Palant, R.L. Amdur, L.S. Chawla // *Curr. Opin. Anaesthesiol.* – 2017– V.1, №30. – P.100 – 104.
464. Pallet, N. Proteinuria typing: how, why and for whom? / N. Pallet, J.-P. Bastard, S. Claeysens [et al.] // *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. – 2019. – V.1, №77. – P.13 – 25.
465. Parr, S.K. Delayed Consequences of Acute Kidney Injury / S.K. Parr, E.D. Siew // *Adv. Chronic Kidney Dis.* – 2016. – V.3, №23. – P.186 – 194.
466. Pasala, S. How to use... serum creatinine, cystatin C and GFR / S. Pasala, J.B. Carmody // *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* – 2017. – V.1, №102. – P.37 – 43.

467. Patel, S. Dabigatran-induced acute interstitial nephritis: an important complication of newer oral anticoagulation agents / S. Patel, M.A. Hossain, F. Ajam [et al.] // *Journal Clin. Med. Res.* – 2018. – V.10, №10. – P.791 – 794.
468. Patinha, D. Adenosine A2A and A3 receptors as targets for the treatment of hypertensive-diabetic nephropathy / D. Patinha, C. Abreu, C. Carvalho [et al.] // *Biomedicines.* – 2020. – V.11, №8. – 529.
469. Pepe, M.S. Limitations of the odds ratio in gauging the performance of a diagnostic, prognostic, or screening marker / M.S. Pepe, H. Janes, G. Longton [et al.] // *Am. J. Epidemiol.* – 2004. – V.9, №159. – P.882–890.
470. Perazella, M.A. Diagnostic value of urine microscopy for differential diagnosis of acute kidney injury in hospitalized patients / M.A. Perazella, S.G. Coca, M. Kanbay [et al.] // *Clin. Journal Am. Soc. Nephrol.* – 2008. – V.6, №3. – P.1615 – 1619.
471. Perazella, M.A. Urine microscopy is associated with severity and worsening of acute kidney injury in hospitalized patients / M.A. Perazella, S.G. Coca, I.E. Hall [et al.] // *Clin. Journal Am. Soc. Nephrol.* – 2010. – V.3, №5. – P.402 – 408.
472. Perazella, M.A. Drug-induced acute kidney injury: diverse mechanisms of tubular injury / M.A. Perazella // *Curr. Opin. Crit. Care.* – 2019. – V.6, №25. – P.550 –557.
473. Perry, H.M. Dynammin-related protein 1 deficiency promotes recovery from AKI / H.M. Perry, L. Huang, R.J. Wilson [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2018. – V.1, №29. – P.194 – 206.
474. Petejova, N. Acute toxic kidney injury / N. Petejova, A. Martinek, J. Zadrazil [et al.] // *Ren. Fail.* – 2019. – V.1, №41. – P.576–594.
475. Piech, T.L. Importance of urinalysis / T.L. Piech, K.L. Wycislo // *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* – 2019. – V.2, №49. – P.233 – 245.
476. Piérard, G.E. Sirius red polarization method is useful to visualize the organization of connective tissues but not the molecular composition of their fibrous polymers / G.E. Piérard // *Matrix.* – 1989. – V.1, №9. – P.68 – 71.
477. Pierson-Marchandise, M. The drugs that mostly frequently induce acute kidney injury: a case - noncase study of a pharmacovigilance database / M. Pierson-Marchandise, V. Gras, J. Moragny [et al.] // *Br. Journal Clin. Pharmacol.* – 2017. – V.6, №83. – P.1341 – 1349.
478. Piscione, T.D. The molecular control of renal branching morphogenesis: current knowledge and emerging insights / T.D. Piscione, N.D. Rosenblum // *Differentiation.* – 2002. – V.6, №70. – P.227 – 246.
479. Polesel, M. Axial differences in endocytosis along the kidney proximal tubule / M. Polesel, A.M. Hall // *Am. Journal Physiol Renal Physiol.* – 2019. – V.6, №317. – P.1526 – 1530.

480. Poyan Mehr, A. De novo NAD⁺ biosynthetic impairment in acute kidney injury in humans / A.P. Mehr, M.T. Tran, K.M. Ralto [et al.] // Nat. Med. – 2018. – V.9, №24. – P.1351 – 1359.
481. Pragasam, V. Oral L-arginine supplementation ameliorates urinary risk factors and kinetic modulation of Tamm-Horsfall glycoprotein in experimental hyperoxaluric rats / V. Pragasam, P. Kalaiselvi, K. Sumitra [et al.] // Clin. Chim. Acta. – 2005. – V. 1–2, №360. – P.141 – 150.
482. Pras, H. Toxic properties of the mushroom *Cortinarius orellanus*. i. chemical characterization of the main toxin of *Cortinarius orellanus* (fries) and *Cortinarius speciosissimus* (Kühn & Romagn) and acute toxicity in mice / H. Prast, E.R. Werner, W. Pfaller [et al.] // Arch. Toxicol. – 1988. – V.1, №62. – P.81 – 88.
483. Priante, G. Cell Death in the kidney / G. Priante, L. Giancesello, M. Ceol [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – V.4, №20. – 3598.
484. Price, C.P. Use of protein:creatinine ratio measurements on random urine samples for prediction of significant proteinuria: a systematic review / C.P.Price, R.G.Newall, J.C. Boyd // Clin. Chem. – 2005. – V.9, №51. – P.1577 – 1586.
485. Prieto-García, L. Pathophysiological mechanisms underlying a rat model of triple whammy acute kidney injury / L. Prieto-García, L. Vicente-Vicente, V. Blanco-Gozaño [et al.] // Lab. Invest. – 2020. – V.11, №100. – P.1455 – 1464.
486. Prozialeck, W.C. Expression of kidney injury molecule-1 (Kim-1) in relation to necrosis and apoptosis during the early stages of Cd-induced proximal tubule injury / W.C. Prozialeck, J.R. Edwards, P.C. Lamar [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2009. – V.3, №238. – P.306 – 314.
487. Puchtler, H. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picrosirius red FBA / H. Puchtler, F.S. Waldrop, L.S. Valentine // Beitr Pathol. – 1973. – V.2, №150. – P.174 – 187.
488. Puchtler, H. Histochemical specificity of staining methods for connective tissue fibers: Resorcin-fuchsin and van Gieson's picro-fuchsin / H. Puchtler, F. Sweat // Z Zellforsch Microsk Anat Histochem. – 1964. – №79. – P. 24 – 34.
489. Qi, R. Renal tubular epithelial cells: the neglected mediator of tubulointerstitial fibrosis after injury / R. Qi, C. Yang // Cell Death Dis. – 2018. – №9. – 1126.
490. Qi, R. Snai1-induced partial epithelial-mesenchymal transition orchestrates p53-p21-mediated G2/M arrest in the progression of renal fibrosis via NF- κ B-mediated inflammation / R. Qi, J. Wang, Y. Jiang [et al.] // Cell Death Dis. – 2021. – V.1, №12. – 44.
491. Qu, Y. A nephron model for study of drug-induced acute kidney injury and assessment of drug-induced nephrotoxicity / Y. Qu, F. An, Y. Luo [et al.] // Biomaterials. – 2018. – №155. – P.41 – 53.

492. Quesada, A. Urinary aminopeptidase activities as early and predictive biomarkers of renal dysfunction in cisplatin-treated rats / A. Quesada, F. Vargas, S. Montoro-Molina [et al.] // *PLoSOne*. – 2012. – V.7, №7. –40402.
493. Raghavan, R. Mechanisms of Drug-Induced Interstitial Nephritis / R. Raghavan, S. Shawar // *Adv. Chronic. Kidney Dis*. – 2017. – V.2, №24. – P.64 – 71.
494. Ralib, A.M. The clinical utility window for acute kidney injury biomarkers in the critically ill / A.M. Ralib, J.W. Pickering, G.M. Shaw [et al.] // *Crit. Care*. – 2014. – V.6, №18. – 601.
495. Ramamoorthy, H. Mitochondrial pathway of apoptosis and necrosis contribute to tenofovir disoproxil fumarate-induced renal damage in rats / H. Ramamoorthy, P. Abraham, B. Isaac [et al.] // *Hum. Exp. Toxicol*. –2019. – V.3, №38. – P.288 – 302.
496. Ramm, S. A High-throughput screening assay to identify kidney toxic compounds / S. Ramm, M. Adler, V.S. Vaidya // *Curr Protoc Toxicol*. – 2016. – №69. – 9.10.1 – 9.10.26.
497. Reagan, W.J. Influence of urine pH on accurate urinary protein determination in Sprague-Dawley rats / W.J. Reagan, B. VanderLind, A. Shearer [et al.] // *Vet. Clin. Pathol*. – 2007. – V.1, №36. – P.73 – 78.
498. Reine, N.J. Urinalysis interpretation: how to squeeze out the maximum information from a small sample / N.J. Reine, C.E. Langston // *Clin. Tech. Small Anim. Pract*. – 2005. – V.1, №20. – P.2 – 10.
499. Richard, J.M. A quantitative structure-activity relationship study on substituted pyridines as a contribution to the knowledge of the toxic effects of orellanine, a toxin from the mushroom *Cortinarius orellanus* / J.M. Richard, G. Taillandier, J.L. Benoit-Guyod // *Toxicon*. – 1985. – V.5, №23. – P.815 – 824.
500. Richard, J.M. Nephrotoxicity of orellanine, a toxin from the mushroom *Cortinarius orellanus* / J.M. Richard, J. Louis, D. Cantin // *Arch. Toxicol*. – 1988. – V.2-3, №62. – P.242 – 245.
501. Rittié, L. Method for picrosirius red-polarization detection of collagen fibers in tissue sections / L. Rittié // *Methods Mol. Biol*. – 2017. – V.1627. – P.395–407.
502. Robinson, C.N. In-vivo evidence of nephrotoxicity and altered hepatic function in rats following administration of diglycolic acid, a metabolite of diethylene glycol / C.N. Robinson, B. Latimer, F. Abreo [et al.] // *Clin Toxicol (Phila)*. – 2017. – V.55, №3. – P.196 – 205.
503. Rodríguez-Iturbe, B. , Johnson RJ, Herrera-Acosta J. Tubulointerstitial damage and progression of renal failure / B. Rodríguez-Iturbe, R.J. Johnson, J. Herrera-Acosta // *Kidney Int Suppl*. – 2005. – V.99. – P.82 – 86.
504. Rojas, A. The role played by perivascular cells in kidney interstitial injury / A. Rojas, F.-C. Chang, S.-L. Lin [et al.] // *Clin. Nephrol*. –2012. – V.5, №77. – P.400 – 408.

505. Rohrmoser, M. Orellanine poisoning: rapid detection of the fungal toxin in renal biopsy material. / M. Rohrmoser, M. Kirchmair, E. Feifel [et al.] // *Journal of toxicology. Clinical toxicology.* – 1997. – V.35, №1. – P.63 – 66.
506. Rosenberger, C. Renal parenchymal oxygenation and hypoxia adaptation in acute kidney injury / C. Rosenberger, S. Rosen, S.N. Heyman // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2006. – V.10, №33. – P.980 – 988.
507. Rota, C. Evaluation of Aution Max AX-4030 and 9UB Uriflet, 10PA Aution sticks urine dipsticks in the automated urine test strip analysis / C. Rota, M. Biondi, T. Trenti // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* – 2012. – V.1, №50. – P. 139 – 146.
508. Rowe, E.S. Preclinical studies of a kidney safe iodinated contrast agent / E.S. Rowe, V.D. Rowe, S. Biswas [et al.] // *J. Neuroimaging.* – 2016. – V.5, №26. – P.511 – 518.
509. Saillenfait, A.M. Changes in urinary proximal tubule parameters in neonatal rats exposed to cadmium chloride during pregnancy / A.M. Saillenfait, J.P. Payan, M.T. Brondeau [et al.] // *Journal Appl. Toxicol.* – 1991. – V.1, №11. – P.23 – 27.
510. Samra, M. False estimates of elevated creatinine / M. Samra, A.C. Abcar // *Perm J.* – 2012. – V.2, №16. – P.51 – 52.
511. Sánchez-Borges, M. Hypersensitivity reactions to non beta-lactam antimicrobial agents, a statement of the WAO special committee on drug allergy / M. Sánchez-Borges, B. Thong, M. Blanca [et al.] // *World Allergy Organ. Journal* – 2013. – V. 31, № 6 (1)18. – P. 1 - 23.
512. Sangeetha Vijayan, P. Biochemical and histopathological responses of the Swiss albino mice treated with uranyl nitrate and its recovery / P. Sangeetha Vijayan, P.D. Rekha [et al.] // *Ren. Fail.* – 2016. – V.5, №38. – P.770 – 775.
513. Sankaralingam, A. Assessment of a semi-quantitative screening method for diagnosis of ethylene glycol poisoning / A. Sankaralingam, A. Thomas, D.R. James [et al.] // *Ann. Clin. Biochem.* – 2017. – V.4, №54. – P.501 – 503.
514. Schaller, K.H. Detection of early kidney damage in workers exposed to lead, mercury, and cadmium (author's transl) / K.H. Schaller, J. Gonzales, J. Thürauf [et al.] // *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B.* – 1980. – V.4-5, №171. – P.320 – 335.
515. Schinstock, C.A. Urinalysis is more specific and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin is more sensitive for early detection of acute kidney injury / C.A. Schinstock, M.H. Semret, S.J. Wagner [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2013. – V.5, №28. – P.1175 – 1185.
516. Scholz, H. Kidney physiology and susceptibility to acute kidney injury: implications for renoprotection / H. Scholz, F.J. Boivin, K.M. Schmidt-Ott [et al.] // *Nat. Rev. Nephrol.* – 2021. – V.5, №17. – P.335 – 349.

517. Schrimpf, C. Mechanisms of fibrosis: the role of the pericyte / C. Schrimpf, J.S. Duffield // *Curr Opin Nephrol Hypertens.* – 2011. – V.3, №20. – P.297–305.
518. Schwenger, V. Advanced glycation endproducts (AGEs) as uremic toxins / V. Schwenger, M. Zeier, T. Henle, E. Ritz // *Nahrung.* – 2001. – V.3, №45. – P.172–176.
519. Seely J. Kidney / J.C. Seely, G.C. Hard, B. Blankenship. – *Boorman's Pathology of the Rat (Second Edition).* – Academic Press, 2018. – P.125–166.
520. Seldén, A.I. Nephrotoxicity of uranium in drinking water from private drilled wells / A.I. Seldén, C. Lundholm, B. Edlund [et al.] // *Environ Res.* – 2009. – V.4, №109. – P.486–494.
521. Selmeçi, L. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique / L. Selmeçi, L. Seres, M. Antal [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2005. – V.3, №43. – P.294–297.
522. Shamsi, A. Structural transition of kidney cystatin induced by silicon dioxide nanoparticles: An implication for renal diseases / A. Shamsi, A. Ahmed, B. Bano // *Int. Journal Biol. Macromol.* – 2017. – V.94 (Pt B). – P.754–761.
523. Sharma, A. Renal functional reserve and renal recovery after acute kidney injury / A. Sharma, M.J. Mucino, C. Ronco // *Nephron. Clin. Pract.* – 2014. – V.1-4, №127. – P.94–100.
524. Shen, J. A comparative study of the sub-chronic toxic effects of three organic arsenical compounds on the urothelium in F344 rats; gender-based differences in response / J. Shen, H. Wanibuchi, M.P. Waalkes [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2006. – V.3, №210. – P.171–180.
525. Shen, H. Xenobiotic Transporters in the Kidney: Function and Role in Toxicity / H. Shen, R.J. Scialis, L. Lehman-McKeeman // *Semin Nephrol.* – 2019. – V.2, №39. – P.159–175.
526. Shevock, P.N. Urinary chemistry of the normal Sprague-Dawley rat / P.N. Shevock, S.R. Khan, R.L. Hackett // *Urol. Res.* – 1993. – V.5, №21. – P.309–312.
527. Shimada, H. Sexual dimorphism of cadmium-induced toxicity in rats: involvement of sex hormones / H. Shimada, T. Hashiguchi, A. Yasutake [et al.] // *Arch. Toxicol.* – 2012. – V.9, №86. – P.1475–1480.
528. Shinke, H. Urinary kidney injury molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 are noninvasive biomarkers of cisplatin-induced nephrotoxicity in lung cancer patients / H. Shinke, S. Masuda, Y. Togashi [et al.] // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2015. – V.5, №76. – P.989–996.
529. Singh, R. Ethylene glycol poisoning: an unusual cause of altered mental status and the lessons learned from management of the disease in the acute setting / R. Singh, E. Arain, A. Buth [et al.] // *Case Rep. Crit. Care.* – 2016. – 9157393.
530. Singh, A.P. Animal models of acute renal failure / A.P. Singh, A. Junemann, A. Muthuraman [et al.] // *Pharmacol Rep.* – 2012. – V.1, №64. – P.31–44.

531. Sinha, V. Urinary tubular protein-based biomarkers in the rodent model of cisplatin nephrotoxicity: a comparative analysis of serum creatinine, renal histology, and urinary KIM-1, NGAL, and NAG in the initiation, maintenance, and recovery phases of acute kidney injury / V. Sinha, L.M. Vence, A.K. Salahudeen // *Journal Investig. Med.* – 2013. – V.3, №61. – P.564 – 568.
532. Slater, M.B. Identifying high-risk medications associated with acute kidney injury in critically ill patients: a pharmacoepidemiologic evaluation / M.B. Slater, A. Gruneir, P.A. Rochon [et al.] // *Pediatr Drugs.* – 2017. – V.1, №19 – P.59 – 67.
533. Šömen Joksić, A. Chelation therapy for treatment of systemic intoxication with uranium: a review / A. Šömen Joksić, S.A. Katz // *Journal Environ. Sci. Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* – 2015. – V.14, №50. – P.1479 – 1488.
534. Son, J.Y. Evaluation of renal toxicity by combination exposure to melamine and cyanuric acid in male Sprague-Dawley rats / J.Y. Son, Y.J. Kang, K.S. Kim [et al.] // *Toxicol. Res.* – 2014. – V.2, №30. – P.99 – 107.
535. Song, M.F. Sema 3A as a biomarker of the activated mTOR pathway during hexavalent chromium-induced acute kidney injury / M.-F. Song, Y. Yang, Z.-W. Yi [et al.] // *Toxicol. Lett.* – 2018. – №299. – P.226 – 235.
536. Song, J. Understanding kidney injury molecule 1: a novel immune factor in kidney pathophysiology / J. Song, J. Yu, G.W. Prayogo [et al.] // *Am Journal Transl. Res.* – 2019. – V.3, №11. – P.1219 – 1229.
537. Soodvilai, S. Germacrone reduces cisplatin-induced toxicity of renal proximal tubular cells via inhibition of organic cation transporter / S. Soodvilai, P. Meetam, L. Siangjong [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* – 2020. – V.11, №43. – P.1693 – 1698.
538. Stammler, L. Renal Effects and carcinogenicity of occupational exposure to uranium: a meta-analysis / L. Stammler, A. Uhl, B. Mayer [et al.] // *Nephron Extra.* – 2016. – V.1, №6. – P.1 – 11.
539. Sternheimer, R. A supravital cytodagnostic stain for urinary sediments / R. Sternheimer // *JAMA.* – 1975. – V.8, №231. – P.826 – 832.
540. Stevens, L.A. Measured GFR as a confirmatory test for estimated GFR / L.A. Stevens, A.S. Levey // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2009. – V.11, №20. – P.2305 – 2313.
541. Stevens, J.S. Rule out acute kidney injury in the emergency department with a urinary dipstick / J.S. Stevens, K. Xu, A. Corker [et al.] // *Kidney Int. Rep.* – 2020. – V.11, №5. – P.1982 – 1992.
542. Sun, B. Urinary biomarker evaluation for early detection of gentamycin-induced acute kidney injury / B. Sun, X. Zhou, Z. Qu [et al.] // *Toxicol Lett.* – 2019. – №300. – P.73 – 80.
543. Suzuki, S. Toxicity of neomycin on enzyme activities of kidney and duodenal mucosa in vivo: organ specificity and species difference between rats and mice / S. Suzuki, S. Hatashima, Y.

Shinzawa [et al.] // *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* – 1994. – V.1, №109. – P.77 – 92.

544. Tabish, M. Colistin-induced acquired Bartter-like syndrome: an unusual cause of meltdown / M. Tabish, M. Mahendran, A. Ray [et al.] // *BMJ Case Rep.* – 2020. – V.2, №13. – e232630.

545. Takaori, K. Severity and frequency of proximal tubule injury determines renal prognosis / K. Takaori, J. Nakamura, S. Yamamoto [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2016. – V.8, №27. – P.2393 – 2406.

546. Takigawa, M. Age-dependent changes in vancomycin-induced nephrotoxicity in mice / M. Takigawa, H. Masutomi, Y. Shimazaki [et al.] // *Journal Toxicol. Pathol.* – 2019. – V.1, №32. – P.57 – 66.

547. Tanaka, R. Sex differences in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury are dependent on the renal sympathetic nervous system / R. Tanaka, H. Tsutsui, M. Ohkita [et al.] // *Eur. Journal Pharmacol.* – 2013. – V.1-3, №714. – P.397 – 404.

548. Tanaka, T. A mechanistic link between renal ischemia and fibrosis / T. Tanaka // *Med. Mol. Morphol.* – 2017. – V.1, №50. – P.1 – 8.

549. Tanaka, S. Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition / S. Tanaka, T. Tanaka, M. Nangaku // *Am. Journal Physiol. Renal Physiol.* – 2014. – V.11, №307. – P.1187 – 1195.

550. Tanase, D.M. The predictive role of the biomarker kidney molecule-1 (KIM-1) in acute kidney injury (AKI) cisplatin-induced nephrotoxicity / D.M. Tanase, E.M. Gosav, S. Radu [et al.] // *Int. Journal Mol. Sci.* – 2019. – V.20, №20. – 5238.

551. Tang, X. Advanced oxidation protein products induce hypertrophy and epithelial-to-mesenchymal transition in human proximal tubular cells through induction of endoplasmic reticulum stress / X. Tang, G. Rong, Y. Bu [et al.] // *Cell Physiol. Biochem.* – 2015. – V.2, №35. – P.816 – 828.

552. Tanida, E. Urinary scandium as predictor of exposure: effects of scandium chloride hexahydrate on renal function in rats / E. Tanida, K. Usuda, K. Kono [et al.] // *Biol Trace Elem Res.* – 2009. – V.3, №130. – P.273 – 282.

553. Tennakoon, A.H. Pathogenesis of type 2 epithelial to mesenchymal transition (EMT) in renal and hepatic fibrosis / A.H. Tennakoon, T. Izawa, M. Kuwamura [et al.] // *Journal Clin. Med.* – 2015. – V.1, №5. – 4.

554. Teo, S.H. Biomarkers in acute kidney injury (AKI) / S.H. Teo, Z.H. Endre // *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* – 2017. – V.3, №31. – P.331 – 344.

555. Tokumoto, M. Glutathione has a more important role than metallothionein-I/II against inorganic mercury-induced acute renal toxicity / M. Tokumoto, J.-Y. Lee, A. Shimada [et al.] // *Journal Toxicol. Sci.* – 2018. – V. 4, №43. – P.275 – 280.

556. Tonomura, Y. Evaluation of the usefulness of urinary biomarkers for nephrotoxicity in rats / Y. Tonomura, N. Tsuchiya, M. Torii [et al.] // *Toxicology*. – 2010. – V.1-3, №273. – P.53 – 59.
557. Tonomura, Y. Decrease in urinary creatinine in acute kidney injury influences diagnostic value of urinary biomarker-to-creatinine ratio in rats / Y. Tonomura, T. Uehara, E. Yamamoto [et al.] // *Toxicology*. – 2011. – V.2-3, №290. – P.241 – 248.
558. Tsuji, S. Sex differences in the excretion levels of traditional and novel urinary biomarkers of nephrotoxicity in rats / S. Tsuji, M. Sugiura, S. Tsutsumi [et al.] // *Journal Toxicol. Sci.* – 2017. – V.5, №42. – P.615 – 627.
559. Tretter, L. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis / L. Tretter, A. Patocs, C. Chinopoulos // *Biochim Biophys Acta*. – 2016. – V. 1857, №8. – P. 1086 – 1101.
560. Tung, R.C. Characteristics of laboratory confirmed ethylene glycol and methanol exposures reported to a regional poison control center / R.C. Tung, S.L. Thornton // *Kans. Journal Med.* – 2018. – V.3, №11. – P.67 – 69.
561. Ueda, H., Sugiyama, K., Yokota, M., Matsuno, K., Ezaki T. Reduction of cisplatin toxicity and lethality by sodium malate in mice / H. Ueda, K. Sugiyama, M. Yokota [et al.] // *Biol Pharm Bull.* – 1998. – V.21, №1. – P. 34 – 43.
562. UK Renal Association clinical practice guidelines 6th edition 2017 [Electronic resource]. – 2017. – Available at: www.renal.org/guidelines.
563. Ulrich-Merzenich, G. Salicylate-based phytopharmaceuticals induce adaptive cytokine and chemokine network responses in human fibroblast cultures / G. Ulrich-Merzenich, F. Hartbrod, O. Kelber [et al.] // *Phytomedicine*. – 2017. – V.34. – P.202 – 211.
564. Usuda, K. Usefulness of the assessment of urinary enzyme leakage in monitoring acute fluoride nephrotoxicity / K. Usuda, K. Kono, T. Dote [et al.] // *Arch. Toxicol.* – 1999. – V.6, №73. – P.346 – 351.
565. Uteng, M. Comparative renal safety assessment of the hepatitis B drugs, adefovir, tenofovir, telbivudine and entecavir in rats / M. Uteng, A. Mahl, N. Beckmann [et al.] // *Toxicol. Sci.* – 2017. – V.1, №155. – P.283 – 297.
566. Uwai, Y. Lithium interferes with the urinary excretion of phenolsulfonphthalein in rats: involvement of a reduced content of α -ketoglutarate, the driving force for organic anion transporters OAT1 and OAT3, in the kidney cortex / Y. Uwai, M. Tsuge, Y. Tokai [et al.] // *Pharmacology*. – 2015. – V.5–6, №96. – P.278 – 283.
567. Vaidya, V.S. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury / V.S. Vaidya, V. Ramirez, T. Ichimura [et al.] // *Am. Journal Physiol. Renal Physiol.* – 2006. – V.2, №290. – P.517 – 529.

568. Vaidya, V.S. A rapid urine test for early detection of kidney injury / V.S. Vaidya, G.M. Ford, S.S. Waikar [et al.] // *Kidney Int.* – 2009. – V.1, №76. – P.108 – 114.
569. Vallon, V. Tubular transport in acute kidney injury: relevance for diagnosis, prognosis and intervention / V. Vallon // *Nephron.* – 2016. – V.3, №134. – P.160 – 166.
570. Van Duijl, T.T. Rational selection of a biomarker panel targeting unmet clinical needs in kidney injury / T.T. van Duijl, D. Soonawala, J.W. de Fijter [et al.] // *Clin. Proteomics.* – 2021. – V.1, №18. – 10.
571. Van Vleet, T.R. Toxic nephropathy: environmental chemicals / Van Vleet T.R., Schnellmann R.G. // *Semin Nephrol.* – 2003. – V.5, №23. – P.500 – 508.
572. Vanmassenhove, J. Subclinical AKI: ready for primetime in clinical practice? / J. Vanmassenhove, W. Van Biesen, R. Vanholder [et al.] // *Journal Nephrol.* – 2019. – V.1, №32. – P.9 – 16.
573. Vattimo, M. de F. Polymyxin B nephrotoxicity: from organ to cell damage / M. de F. F. Vattimo, M. Watanabe, C.D. da Fonseca [et al.] // *PLoS One.* – 2016. – V.8, №11. – e0161057.
574. Vázquez-Carballo, C. Toll-like receptors in acute kidney injury / C. Vázquez-Carballo, M. Guerrero-Hue, C. García-Caballero [et al.] // *Int. Journal Mol. Sci.* – 2021. – V.1, №22. – 816.
575. Vega, G. The cellular and signalling alterations conducted by TGF- β contributing to renal fibrosis / G.Vega, S. Alarcón, R. San Martín // *Cytokine.* – 2016. – №88. – P.115 – 125.
576. Vega, J. Renal functional reserve. Concept and potential application in clinical practice / J. Vega, E.J.P. Huidobro // *Rev. Med. Chil.* – 2019. – V.10, №147. – P. 1323 – 1328.
577. Velez-Quinones, M.A. Simultaneous Determination of Uranium and Depleted Uranium Isotopic Ratio Using Inductively Coupled Mass Spectrometry / M.A. Velez-Quinones, H. Xu, N. Vo [et al.] // *Curr Protoc Toxicol.* – 2018 – V.78, №1. – e59.
578. Venkatachalam, M.A. Failed tubule recovery, AKI-CKD transition, and kidney disease progression / M.A. Venkatachalam, J.M. Weinberg, W. Kriz [et al.] // *Journal Am. Soc. Nephrol.* – 2015. – V.8, №26. – P. 1765 – 1776.
579. Verheij, C. Emergency Department visits due to intoxications in a Dutch university hospital: occurrence, characteristics and health care costs // C. Verheij, P.P.M. Rood, C.K. Deelstra [et al.] // *PLoS One.* – 2019. – V.12, №14. – e0226029.
580. Vicente-Vicente, L. A systematic meta-analysis on the efficacy of pre-clinically tested nephroprotectants at preventing aminoglycoside nephrotoxicity / L. Vicente-Vicente, A.G. Casanova, M.T. Hernández-Sánchez [et al.] // *Toxicology.* – 2017. – V.377. – P.14 – 24.

581. Vilay A.M. Indicators for serious kidney complications associated with toxic exposures: an analysis of the national poison data system / A.M. Vilay, C.S. Wong, R.M. Schrader [et al.] // *Clin. Toxicol. (Phila)*. – 2013. – V.2, №51. – P.96 – 105.
582. Von Mässenhausen, A. Cell death pathways drive necroinflammation during acute kidney injury / A. Von Mässenhausen, W. Tonnus, A. Linkermann // *Nephron*. – 2018. – V.2, №140 – P.144 – 147.
583. Vora, S. Acute renal failure due to vancomycin toxicity in the setting of unmonitored vancomycin infusion / S. Vora // *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. – 2016. – V.4, №29. – P.412 – 413.
584. Waikar, S.S. Biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury / S.S. Waikar, J.V. Bonventre // *Nephron. Clin. Pract.* – 2008. – V.4, №109. – P.192 – 197.
585. Walmsley, S.J. Proteomic analysis of brush-border membrane vesicles isolated from purified proximal convoluted tubules / S.J. Walmsley, C. Broeckling, Ann Hess [et al.] // *Am. Journal Physiol. Renal Physiol.* – 2010. – V.6, №298. – P.1323 – 1331.
586. Wang, X.J. Nrf2 protects human bladder urothelial cells from arsenite and monomethylarsonous acid toxicity / X.-J. Wang, Z. Sun, W. Chen [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2007. – V.2, №225. – P. 206 – 213.
587. Wei, Q. Differential gender differences in ischemic and nephrotoxic acute renal failure / Q. Wei, M.H. Wang, Z. Dong // *Am. Journal Nephrol.* – 2005. – V.5, №25. – P. 491 – 499.
588. Whiteman, P. The quantitative determination of glycosaminoglycans in urine with Alcian Blue 8GX / P. Whiteman // *Biochem. Journal* – 1973. – V.2, №131. – P.351 – 357.
589. WideScreen Rat Kidney Toxicity Assays [Electronic resource]. – 2008. – Available at: https://www.merckmillipore.com/RU/ru/product/WideScreen-Rat-Kidney-Toxicity-Panel-1,EMD_BIO-72164.
590. Wilmer, M.J. Kidney-on-a-chip technology for drug-induced nephrotoxicity screening / M.J. Wilmer, C.P. Ng, H.L. Lanz [et al.] // *Trends Biotechnol.* – 2016. – V.2, №34. – P. 156 – 170.
591. Witko-Sarsat, V. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia / V. Witko-Sarsat, M. Friedlander, C. Capeillère-Blandin [et al.] // *Kidney Int.* – 1996. – V.5, №49. – P.1304 – 1313.
592. Witko-Sarsat, V. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? / V. Witko-Sarsat, V. Gausson, B. Descamps-Latscha // *Kidney Int. Suppl.* – 2003. – V.84. – P.11 – 14.
593. Wittschieber, D. Fatal poisoning with diethylene glycol in an unusual setting / D. Wittschieber, K. Heuberger, R. Schulz [et al.] // *Forensic. Sci. Med. Pathol.* – 2019. – V.4, №15. – P.649 – 652.
594. Wlodkovic, D. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death / D. Wlodkovic, W. Telford, J. Skommer [et al.] // *Methods Cell Biol.*, 2011. – V.103. – P.55 – 98.

595. Won, A.J. Discovery of urinary metabolomic biomarkers for early detection of acute kidney injury / A.J. Won, S. Kim, Y.G. Kim [et al.] // *Mol. Biosyst.* – 2016. – V.1, №12. – P.133 – 144.
596. Wrońska-Nofer, T. Scintigraphic assessment of renal function in steel plant workers occupationally exposed to lead / T. Wrońska-Nofer, A. Pisarska, M. Trzcinka-Ochocka [et al.] // *Journal Occup. Health.* – 2015. – V.2, №57. – P.91 – 99.
597. Wu, H. Drug-induced nephrotoxicity: pathogenic mechanisms, biomarkers and prevention strategies / H. Wu, J. Huang // *Curr. Drug Metab.* – 2018. – V.7, №19. – P.559 – 567.
598. Wu Y. Pathological Significance of a Panel of Urinary Biomarkers in Patients with Drug-Induced Tubulointerstitial Nephritis / Y. Wu, L. Yang, T. Su [et al.] // *Clin. Journal Am. Soc. Nephrol.* – 2010. – V.5, № 11. – P.1954 – 1959.
599. Wunnapuk, K. Renal biomarkers predict nephrotoxicity after paraquat / K. Wunnapuk, X. Liu, P. Peake [et al.] // *Toxicol. Lett.* – 2013. – V.3, №222. – P.280 – 288.
600. Xu, Q. Serum cystatin c is not superior to serum creatinine for early diagnosis of contrast-induced nephropathy in patients who underwent angiography / Q. Xu, N.N. Wang, S.B. Duan [et al.] // *Journal Clin. Lab. Anal.* – 2017. – V.5, №31. – e22096.
601. Xu, Y. Endoplasmic reticulum stress and its effects on renal tubular cells apoptosis in ischemic acute kidney injury / Y. Xu, M. Guo, W. Jiang [et al.] // *Ren. Fail.* – 2016. – V.5, №38. – P.831–837.
602. Yamate, J. Cisplatin-induced renal interstitial fibrosis in neonatal rats, developing as solitary nephron unit lesions / J. Yamate, Y. Machida, M. Ide [et al.] // *Toxicol. Pathol.* – 2005. – V.2, №33. – P.207 – 217.
603. Yan, L. Sternheimer-Malbin Staining to Detect Decoy Cells in Urine of 213 Kidney Transplant Patients / L.Yan, H. Guo, L. Han [et al.] // *Transplant Proc.* – 2020. – V.52, №3. – P.823 – 828.
604. Yang, P. Ninety-day nephrotoxicity evaluation of 3-MCPD 1-monooleate and 1-monostearate exposures in male Sprague Dawley rats using proteomic analysis / P. Yang, J. Hu, J. Liu [et al.] // *Journal Agric. Food. Chem.* – 2020. – V.9, №68. – P.2765 – 2772.
605. Yang, L. How Acute Kidney Injury Contributes to Renal Fibrosis / L. Yang // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2019. – V.1165. – P. 117 – 142.
606. Yang, Y. Establishing equations to evaluate 24 hour urine protein excretion using routine urinalysis / Y. Yang, Y. Xie, C. Wang [et al.] // *Nephrology (Carlton).* – 2014. – V.19, №11. – P.685 – 692.
607. Yang, C.Y. Diagnostic accuracy of urine protein/creatinine ratio is influenced by urine concentration / C.-Y. Yang, F.-A. Chen, C.-F. Chen [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – V.9, №10. – e0137460.

608. Yue, Y.C. The toxicological mechanisms and detoxification of depleted uranium exposure / Y.-C. Yue, M.-H. Li, H.-B. Wang [et al.] // *Environ. Health Prev. Med.* – 2018. – V.1, №23. – 18.
609. Zager, R.A. Parenteral iron treatment induces MCP-1 accumulation in plasma, normal kidneys, and in experimental nephropathy // *Kidney Int.* – 2005. – V.68, №4. – P. 1533 – 1542.
610. Zalups, R.K. Nephrotoxicity of inorganic mercury co-administrated with L-cysteine / R.K. Zalups, D.W. Barfuss // *Toxicology.* – 1996. – V.1, №109. – P.15–29.
611. Zalups, R.K. Human organic anion transporter 1 mediates cellular uptake of cysteine-S conjugates of inorganic mercury / R.K. Zalups, A.G. Aslamkhan, S. Ahmad // *Kidney Int.* – 2004. – V.66, №1. – P.251 – 261.
612. Zbinden, G. Nephrotoxicity screening in rats; general approach and establishment of test criteria / G. Zbinden, K. Fent, M.H. Thouin // *Arch. Toxicol.* – 1988. – V.5, №61. – P.344 – 348.
613. Zhang, Z. Cystatin C in prediction of acute kidney injury: a systemic review and meta-analysis / Z. Zhang, B. Lu, X. Sheng, N. Jin // *Am. Journal Kidney Dis.* – 2011. – V.3, №58. – P.356 – 365.
614. Zhao, W. SIRT3 Protects against acute kidney injury via AMPK/mTOR-regulated autophagy / W. Zhao, L. Zhang, R. Chen [et al.] // *Front Physiol.* – 2018. – V.9. – 1526.
615. Zhou, K. Dimethyl fumarate ameliorates endotoxin-induced acute kidney injury against macrophage oxidative stress / K. Zhou, M. Xie, S. Yi [et al.] // *Ren Fail.* – 2021. – V.43, N.1. – P. 1229 – 1239.
616. Zhou, Y. Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium / Y. Zhou, V.S. Vaidya, R.P. Brown [et al.] // *Toxicol Sci.* – 2008. – V.1, №101. – P.159 – 170.
617. Zhu, G. Renal dysfunction induced by long-term exposure to depleted uranium in rats / G. Zhu, X. Xiang, X. Chen [et al.] // *Arch. Toxicol.* – 2009. – V.1, №83. – P.37 – 46.
618. Zollinger, H.U., Mihatsch, M.J. *Renal Pathology in Biopsy.* Springer, Berlin. – 1978. – 684 p.
619. Zou, L. Molecular mechanisms for species differences in organic anion transporter 1, OAT1: implications for renal drug toxicity / L. Zou, A. Stecula, A. Gupta [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2018. – V.1, №94. – P.689 – 699.