


В печать.

Председатель Диссертационного
совета 68.1.005.01

 В.А. Баринов
28.06.2022г.

На правах рукописи



СИВАК

Константин Владимирович

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ НОВЫХ ПОДХОДОВ
К ДИАГНОСТИКЕ И ФАРМАКОТЕРАПИИ
ТОКСИЧЕСКИХ НЕФРОПАТИЙ**

3.3.4. Токсикология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» и Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

Официальные оппоненты: **Софронов Генрих Александрович**
доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки Российской Федерации, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, научный руководитель Института
Афанасьев Василий Владимирович
доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры скорой медицинской помощи, главный токсиколог Ленинградской области
Никифоров Александр Сергеевич
доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, ведущий научный сотрудник 2 управления научно-исследовательского испытательного центра (медико-биологической защиты)


Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН)

Защита состоится «___» _____ 2022 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета 68.1.005.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» (192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д.1)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке и на сайте (www.toxicology.ru) Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства»

Автореферат разослан: «___» _____ 2022 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета 68.1.005.01
доктор медицинских наук, профессор



Луковникова Любовь Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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) [Мировая статистика здравоохранения, 2018]. 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, лекарственными средствами с нефротоксическим потенциалом, природными нефротоксинами, веществами, вызывающими миолиз, могут обуславливать развитие ренального фенотипа диффузного двустороннего острого повреждения почек (ОПП) – частного и наиболее типичного варианта токсической нефропатии, а также быть причиной тубулоинтерстициального нефрита с исходом в нефрофиброз (ТИФ) или нефрогенный системный фиброз [Лужников Е.А., 2000; Мусселиус С.Г., 2002; Cosyns J.P., 2003; Ливанов Г.А., 2005; Рейхарт Д.В., 2007; Huang W.H., 2007; Perazella M., 2008; Блейкли С., 2013; Vilay A.M., 2013; Bunawan N.C., 2014; Смирнов А.В., 2015; Ермоленко В.М., 2017; Diaz J.H., 2018; Остроумова О.Д., 2020; Horowitz B.Z., 2020; Huang H., 2020].

Под термином «токсическая нефропатия» подразумевается развитие повреждения почек в результате химической травмы (отравления) или терапии лекарственными средствами. 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, высокая скорость метаболизма канальцевых клеток в петле Генле, поглощение белков апикальными мембранами канальцев путём рецептор-опосредованного эндоцитоза, базолатеральный тубулярный транспорт ксенобиотиков через транспортёры органических катионов и анионов [Archer L., 2004; Perazella M., 2019]. Этиологическими факторами являются: токсическое поражение клубочков и эпителия почечных канальцев прямыми нефротоксинами, внутриканальцевая обструкция патологическими цилиндрами и кристаллами, некротический папиллит, лекарственный и идиопатический острый тубулоинтерстициальный нефрит, быстропрогрессирующий гломерулонефрит, микроангиопатии, а нефротоксины составляют 80–90% почечной этиологии [Ермоленко В.М., 2017; Остроумова О.Д., 2020]. Типовые нефротоксины представлены в таблице 1.

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 [Rosenberger C., 2006; Linkermann A., 2014; Casanova A.G., 2017; Martin-Sanchez D., 2017; Von Mässenhausen A., 2018; Tokumoto M., 2018; Priante G., 2019; Belavgeni A., 2020; Pais G.M., 2020; Li J., 2020; Scholz H., 2021].

Утрата детоксицирующих функций почек оказывает существенное влияние на сердечно-сосудистую, дыхательную и гепатобилиарную системы, вызывая общие нарушения гомеостаза [Смирнов А.В., 2015; Ермоленко В.М., 2017]. ОПП токсического генеза является жизнеугрожающим состоянием, обуславливает высокий риск летального исхода (30-40%) [Николаев А.Ю., 2011; Fayad

А.И., 2018] и требует незамедлительной терапии [Лужников Е.А., 2008], включающей в себя: гастроинтестинальную сорбцию [Мусселиус С.Г., 2002], в 50% случаев гемодиализ [Назаров А.В., 2005; Ермоленко В.М., 2017], перитонеальный диализ [Голигорский С.Д., 1969; Мусселиус С.Г., 2002; Пилотович В.С., 2009; Ермоленко В.М., 2017; UK Renal Association, 2017], альбуминовый диализ (MARS) и плазмофильтрацию с адсорбцией и диализом (PFAD) [Ермоленко В.М., 2017], а также мероприятия, направленные на поддержание эффективного почечного кровоснабжения [Смирнов А.В., 2015; Батюшин М.М., 2016; Попов С.В., 2021] и ограничение фиброза [Николаев А.Ю., 2011; Батюшин М.М., 2016].

Таблица 1 – Классификация нефротоксинов по месту их действия на структуры нефрона

Нефротоксины	«Точки приложения»			
	Клубочек и сосуды	Проксимальный каналец (ПК)	Дистальный каналец (ДК)	Интерстиций
Промышленные токсиканты	Металлы: Au, Co, Hg РЗЭ: Eu, 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 Цитринин Яд горбоносой гадюки	Цитринин Монокроталин Липополисахарид	Аристолохиевая кислота
Лекарственные средства	Доксорубицин Пурамицин Пеницилламин Циклоспорин Циклофосфамид	Ацетаминофен Аминогликозиды Гликопептиды Тетрациклины Цефалоспорины НПВС Диатризоат Циклофосфамид	Амфотерицин Ацикловир Сульфадиазин Такролимус Циклоспорин Цисплатин	Бета-лактамы антибиотики Ванкомицин Дифенин НПВС Пеметрексед Фенитоин Цисплатин

Детоксикационную терапию наиболее целесообразно начинать в токсикогенную и раннюю соматогенную фазы отравления и включать в неё специфические антидоты (например, фомепизол, этанол, стирипентол при отравлении гликолями) [Brent J., 1999; Бонитенко Е.Ю., 2005; Fowles J., 2017] и фармакотерапию (регуляторы КОС, осмотические и петлевые диуретики, антигипоксанты, нефро-, цитопротекторы и др.) [Афанасьев В.В., 2009; Афанасьев В.В., 2012; Батюшин М.М., 2016; Попов С.В., 2014]. В тоже время, наиболее эффективной мерой профилактики развития фатальных последствий острых отравлений является ранняя диагностика – как химико-токсикологическая [Мусселиус С.Г., 2002; Савчук С.А., 2019; Бонитенко Е.Ю., 2005; Бушуев Е.С., 2018], так и на основе биомаркеров повреждения почек [Waikar S.S., 2008; Wunnapuk K., 2013; Ralib A.M., 2014; Gaião S.M. 2017; Ostermann M., 2020].

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 ОПП при токсических нефропатиях основывается на совокупности клинических признаков и результатов лабораторных исследований мочи. 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 [Gibbs A., 2005; Gil H.W., 2009; Ермоленко В.М., 2017; Goldstein S.L., 2021]. Наряду с измерением в крови уровней мочевины и креатинина (применяемые в клинической практике тесты для оценки скорости клубочковой фильтрации), необходимо проводить анализ мочи, который особенно важен для выявления повреждения канальцев. К биомаркерам в моче относят ряд ферментов, составляющих до 40% цитоплазматического содержимого нефротелия разных зон и участков нефронов [Kocaoğlu S., 1994; Zalups R., 1996; Usuda K., 1999; Animal clinical chemistry, 2009; Cheng P., 2020].

Через один день после введения цисплатина в возрастающем диапазоне доз (2,5, 5 или 7,5 мг/кг) наблюдали увеличение уровня эктодомена молекулы-1 повреждения почки – Kim-1 в моче примерно в 3-5 раз [Vaidya V.S., 2006]. Выделение на ранней стадии NGAL (липокалин-2) нефротелиоцитами в мочу сигнализирует об ОПП при отравлении паракватом [Gil H.W., 2009]. TIMP-2 и IGFBP7 показали наилучшую прогностическую ценность (AUC=0,86), цистатин С (CyC) в моче был вторым наиболее эффективным биомаркером (AUC=0,79), а максимальное количество доказательств было получено для NGAL с AUC=0,72 [Van Duijl T.T., 2021]. Для достижения клинической эффективности и окончательного диагноза необходимо установить пороговое значение уровня биомаркеров с высокой 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 [Goldstein S.L., 2021]. 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 [Van Duijl T.T., 2021], гематурии, лейкоцитурии и протеинурии на фоне приёма НПВС и анальгетиков [Батюшин М.М., 2006], а общий анализ мочи в сочетании с микроскопией позволял понять локализацию и причину ОПП [Mercado, 2019]. Значения ≥ 2 по системе оценки мочевого осадка (наличие любых цилиндров или RTEC) у пациентов с ОКН является чрезвычайно надёжным предиктором ОПП [Perazella M., 2010]. Однако работ, оценивающих кинетику выделения маркеров с мочой для диагностики и прогноза течения нефропатий токсического генеза, в научной литературе представлено крайне мало. Через 4 часа после инъекции малеата натрия имело место значительное увеличение концентрации моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1) в плазме как биомаркера ОПП [Munshi R., 2011]. В другом исследовании было установлено выделение с мочой биомаркера некроптоза нефротелиоцитов – циклофилина А (CypA) [Cabello R., 2021]. 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 разных производителей), что наряду с общей информационной недостаточностью результатов по самкам свидетельствует о необходимости дальнейших исследований [Gautier J.C., 2014].

Протеинурия как следствие повреждения канальцев и клубочков признана независимым фактором риска почечных заболеваний [Pallet N., 2019; Ikeda M., 2021]. Определение соотношения белок-креатинин в моче позволяет «исключить» наличие значительной протеинурии [Price C.P., 2005; Yang Y., 2014], тогда как качественные тесты на протеинурию и гематурию имеют низкую чувствительность [Naruse M., 2020]. Электрофоретическое разделение является наиболее доступным методом определения качественных особенностей протеинурии [Pallet N., 2019]. Тубулярный тип протеинурии был обнаружен при различных нефропатиях, отравлениях и гипоксии [Чиж А.С., 1983; Candiano G., 2010; Magalhães P., 2018; He T., 2021].

Несмотря на существование в настоящее время большого количества биомаркеров повреждения 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 [Ostermann M., 2020]. Будущие исследования должны быть сосредоточены на изучении механизмов повреждения с целью расширения знаний о фенотипах ОПП на основе их патофизиологии [Albert C., 2020]. Таким образом, биомаркеры повреждения необходимы для детальной диагностики данной патологии при отравлениях и у пациентов, которым назначены нефротоксические препараты.

Проблема использования цитопротекторов входит в стратегическое направление современной неотложной медицины, фармакологии и окончательно не решена [Афанасьев В.В., 2009]. Применение антигипоксанта конфумина позволяет избежать перегрузки ОЦК [Попов С.В., 2014]. 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 [Afjal M.A., 2019]. При почечной гипоксии, ишемии и воспалении высокоселективные антагонисты A_3AR [Min H.S., 2016] и агонисты A_2AR [Patinha D., 2020] ослабляют прогрессирование почечного фиброза и обладают ренопротекторным действием. Антиапоптотическая активность альфа-липоевой кислоты является ключевым механизмом снижения нефротоксичности кадмия [Luo T., 2017], а коррекция гипоксии является многообещающей стратегией для блокирования перехода от ОПП к ХБП [Tanaka S., 2014]. Метилглюкамин *in vitro* снижает цитотоксичность урана более чем на 70% [Muller D.S., 2006/2008]. Препараты с антиоксидантной активностью, ингибиторы обратного захвата аминокликозидов, индукторы экскреции и блокаторы кальциевых каналов продемонстрировали значимую нефропротекцию [Vicente-Vicente L., 2017]. Ингибирование некроптозного белка RIPK1 с помощью некростатина-1 (Nec-1) ослабляло гентамицин-индуцированный некроз, воспаление и фиброз почек у мышей [Huang H., 2020]. Нефропротекторы растительного происхождения, содержащие комплексы биологически активных веществ, высоко эффективны для профилактики нефротоксичности [Лесиовская Е.Е., 2007].

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 последствий интоксикации. Это не позволяет оптимизировать профилактику, неотложную и реабилитационную терапию токсических нефропатий. Многофакторный характер этиологии, патогенеза ОПП и функциональная неоднородность различных сегментов нефрона препятствуют достижению клинических успехов. При изучении новых ренопротекторных стратегий необходимо учитывать физиологическую гетерогенность почек [Scholz H., 2021]. 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 настоящей 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. 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, моноцитарного хемотаксического белка-1, трансформирующего ростового фактора бета 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 молекулы-1 повреждения почки 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 препаратов хофитол, нефрозолид, канефрон Н и композиции экстрактов золотарника, репешка и череды на экспериментальных моделях токсических нефропатий.

Теоретическая и практическая значимость. 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 – ТРА (фрагменты цитокератина СК 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, RBP, 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 «Оценка возможности развития последствий острого и пролонгированного воздействия ураном» / Саватеева-Любимова Т.Н., Сивак К.В., Стосман К.И., Наволоцкий Д.В., Иваненко Н.Б. МР ФМБА России 12.29-15. – М., 2015 – 32 с. 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 нефропротекторное действие. Издано руководство «Доказательная фитотерапия. Руководство для врачей и провизоров», 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 клиничко-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 [^{238}U] и увеличивает выживаемость крыс.
4. Диметилксобутилфосфонилдиметилат расширяет возможности стандартной антидотной терапии острого отравления этиленгликолем в токсикогенной фазе, ограничивая развитие 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, нефрозолит, 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 диметилксобутилфосфонилдиметилата 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 и 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 «Фармобразование-2018» (Воронеж, 2018), Всероссийской общественной организации токсикологов (Санкт-Петербург, 2019), Междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Endourocancer meeting-2021» (Санкт-Петербург, 2021).

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 проведенных 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 научных работы, из них 26 научных статьи (15 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 6 – в отечественных биомедицинских журналах, 5 в зарубежных журналах) и 18 тезисов докладов на отечественных и 1 на зарубежных конференциях. 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. Диссертация соответствует

паспорту специальности 3.3.4. Токсикология (токсикокинетика, токсикодинамика, избирательная токсичность, лечение интоксикаций).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе диссертации представлен обзор современной научной литературы по проблеме эпидемиологии, этиологии и патогенеза токсических нефропатий, представлены современные методы изучения нефротоксичности и методы терапии нефропатий токсического генеза. Во второй главе представлены материалы и методы исследований. В третьей главе представлено экспериментальное обоснование новых подходов к диагностике токсических нефропатий, включающие разработку новых критериев оценки развития нефропатологии, функциональные и морфологические изменения в диагностике токсических нефропатий. В четвертой главе представлено экспериментальное обоснование патогенетической фармакотерапии токсических нефропатий на основании скрининга перспективных средств терапии, изучения антидотных свойств гидрокарбоната натрия в составе раствора для перитонеального диализа, изучение детоксицирующих свойств диметилкобобуттилфосфонилдиметилата, эффективности фумарата натрия и фитопрепаратов при токсических нефропатиях. В пятой главе диссертации проведено обобщение полученных результатов в виде обсуждения. Представлено заключение, выводы и практические рекомендации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нефротоксины и лекарственные средства. В работе использованы 23 типовых нефротоксина и лекарственные препараты с нефротоксическим действием: ртути дихлорид (сулема), кадмия хлорид, радио-нефротоксинуранил ацетатдигидрат (УАД), калия бихромат, мертиолят (тиомерсал), какодилат натрия, цисплатин, этиленгликоль, 1,2-дихлорэтан, тетрахлорметан, уксусная кислота, малеат натрия, амфотерицин Б, гентамицина сульфат, капреомицина сульфат, пefлоксацинамезилат, ацикловир, амброксола гидрохлорид, ацеклофенак натрия, сульфаниламидные препараты, фуросемид, циклоспорин А, циклофосфамид; экстракт Паутинника красивейшего 1:2, экстракт Галерины осенней 1:2, сем. *Cortinariaceae*. Лекарственные препараты использовали в форме фармацевтических субстанций. Химические вещества были категории химически чистые и особо чистые, полученные из Sigma-Aldrich (США), AcrosOrganics (Бельгия).

При изучении фармакологической активности применяли следующие препараты (ГЛФ) и фармацевтические субстанции (ФС): валсартан (ФС), доксазозин (ФС), допамина гидрохлорид (ФС), индапамид (ФС), карведилол (ФС), нитрендипин (ФС), пропранолол (ФС), сулодексид (ГЛФ), торасемид (ФС), триметазидин (ФС), тригидрокситрансстильбен (ресвератрол, ФС), тетрагидроксиглукопиранозилксантен (мангиферин, ГЛФ), фумарат натрия (конфумин ФС, 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 канадского, репешка аптечного и череды трехраздельной (соотношение компонентов – 66:27:7%, содержание сапонинов 2,5%, флавоноидов – 0,5%, СПГХФУ).

Клеточные культуры. Изучение цитотоксичности в условиях *in vitro* проводили на монослойной культуре клеток MDCK (ССL34, почка спаниеля), LLC-MK2 (ССL7, почка обезьяны), являющихся модельными культурами клеток почечного эпителия.

Животные тест-системы. В работе были использованы мыши линии *C57BL/6J*, крысы белые беспородные, линии *Wistar*, *Sprague-Dawley* (филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ России, филиал «Электрогорский» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, ПЛЖ «Пушино»). Крысы имеют высокую степень

гомологии маркеров в S1-3 сегментах [Frazier K.S., 2019]. Гуманное обращение с лабораторными животными было организовано в соответствии с Директивой 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»; Rus-LASA, 2012, «Лабораторные животные» (Москва, 2003) и одобрено биоэтической комиссией (Протокол биоэтической комиссии 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). Эвтаназию проводили одномоментной декапитацией под наркозом (применялся ксилазин и золетил) с тотальным забором крови.

Физиологические методы. Мочу животных собирали в метаболических клетках Tecniplast Metabolic Cage for rats – mice (Tecniplast) при свободном доступе к питьевой воде. Вычисляли клиренс эндогенного креатинина, фракционную экскрецию натрия, концентрационный индекс по осмолярности ($KI_{осм}$), величину максимальной реабсорбции осмотически свободной воды ($T_{H_2O}^c$) [Щюк О., 1975; Рябов С.И., 1997]. Транстубулярный калиевый градиент (ТТКГ) вычисляли по уравнению Гальперина [Ethier J.H., 1990; Halperin M.L., 1998].

Токсикологические методы. Все яды – типовые нефротоксины применяли в токсических ($1 \times LD_{50} - LD_{100}$) и субтоксических ($\leq 1 \times LD_{50}$ при многократном введении) дозах. Общая схема (дизайн) экспериментов представлена на рисунке 1. Контрольной группе животных в качестве плацебо вводили воду очищенную в эквивалентном объёме.

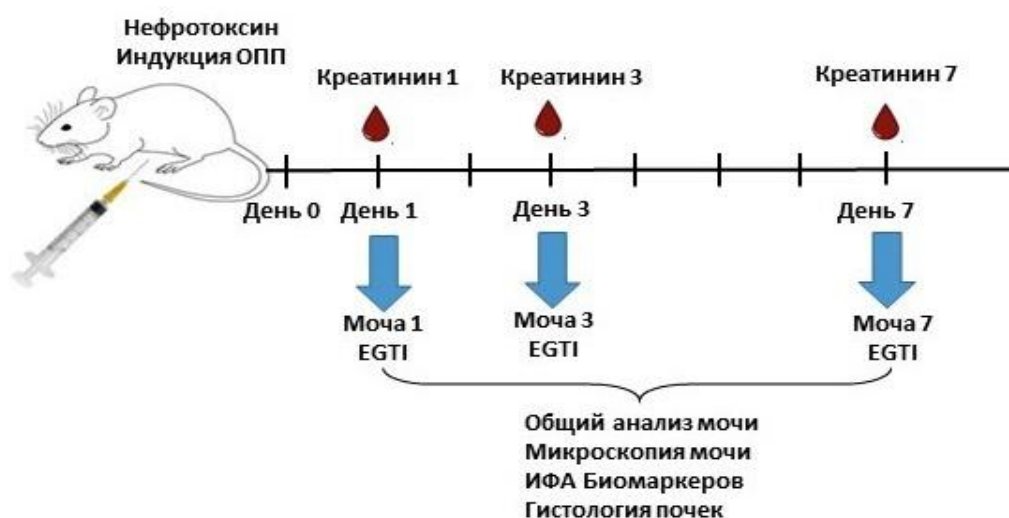


Рисунок 1 – Типовая схема токсикологических экспериментов на лабораторных животных.

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). 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 кожной 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 (0,2-0,5 мл/кг), тетрахлорметан (2,5 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, трисульфона, 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*) [Holmdahl J., 2001], содержащего 2,2'-бипиридин-3,3',4,4'-тетрол-1,1'-диоксид – орелланин 9 ± 1 мг/г, и Галерины осенней (*Galerina marginata = G. autumnalis*) [Мусселиус С.Г., 2002], содержащей бициклические октапептидные аматоксины 190 ± 8 мкг/г. Экстракт из грибов готовили методом перколяции 50% этанолом в соотношении 1:2 (масса/объем). Токсическую дозу экстрактов грибов вводили однократно в/б крысам (Паутинник) и мышам (Галерина).

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. Химико-токсикологический анализ проводили путём качественного обнаружения и количественного инструментального анализа в биоматериале отравленных животных, а также в извлечениях из грибов. Измерения концентрации изотопа урана [^{238}U] проводили на масс-спектрометре с ионизацией в индуктивно-связанной плазме ELEMENT 2 (Thermo FisherScientific) (совместно с кандидатом химических наук Н.Б. Иваненко), 1,2-дихлорэтана методом газо-жидкостной хроматографии с детектором электронного захвата на приборе «Хроматэк-Кристалл 5000.2» (совместно с кандидатом химических наук Г.Н. Кульбицким), этиленгликоля после дериватизации на газовом хроматографе с масс-селективным детектором GCMS-QP2010Plus (Shimadzu) (совместно с кандидатом химических наук И.К. Журкович). Орелланин определяли хромато-спектрофотометрическим методом, а альфа-аманитин – методом иммуноферментного анализа (AMANITIN ELISA, Bühlmann Lab. AG) на спектрофотометре Synergy2 и EPOCH2 (BioTek Instruments Inc.).

Для исследования кинетики выделения биомаркеров УАД (CAS 6159-44-0) вводили крысам самкам линии *Sprague-Dawley* с массой тела 175-199 г в/ж в дозе 30 мг/100 г массы тела однократно через атравматический зонд. Крысы были разделены на 2 группы: 1 группа – интактные животные (12 особей), 2 группа – животные с индуцированным ОПП (36 особей), у которых от 12 особей проводили сбор мочи на 1-е, 3-и и 7-е сутки после отравления. В крови определяли креатинин, в моче измеряли концентрацию биомаркеров, проводили гистологическое исследование почек.

Фармакологические методы. Оценку токсичности испытуемых веществ, цитотоксическую концентрацию IC_{50} и влияние нефропротекторов *in vitro* проводили методом захвата нейтрального красного (NRU) [Borenfreund E., 1988].

Проведение перитонеального диализа (ПД). Антидотную активность гидрокарбоната натрия в остром эксперименте проверяли при в/в введении крысам самкам в течение 3 дней 4% гидрокарбонат

натрия в эффективной дозе 15 мл/кг после однократного введения уранил ацетата ($1 \times LD_{50}$). Для проведения ПД приготавливали стандартный раствор (А – аналог препарата дианил), и раствор (Б), содержащий стерильные фармакопейные субстанции: глюкозы моногидрат 2,5%, калия хлорид 0,04%, натрия хлорид 0,55%, натрия ацетат тригидрат 0,50%, натрия гидрокарбонат 1,5% (Медполимер). Растворы готовили в асептических условиях на апиrogenной воде для инъекций. Для моделирования ОПП животных за 10 ч лишали корма и вводили однократно в/б раствор УАД в дозе 20 мг/кг. Крысы самцы линии *Sprague-Dawley* с массой тела 260-320 г. были разделены на группы: 1 группа – УАД (контроль, $n=8$); 2 группа – УАД за 43 часа до начала стандартного ПД (раствор А) ($n=20$), 3 группа – УАД за 43 часа до начала ПД с добавлением гидрокарбоната натрия (раствор Б) ($n=20$). Наркотизированным животным растворы А и Б вливали (V_{in}) в брюшное пространство через иглу N25G и силиконовый гепаринизированный катетер с двумя полиэфирными манжетами по системе термостата с температурой 38°C (Shellab) с помощью перистальтического насоса Pharmacia (Uppsala) со скоростью 2 мл/мин в эффективном объёме 100 мл/кг [Najar D., 2018] и времени экспозиции 40 минут (каждый сеанс) с последующим обратным сливанием через насос в ёмкости для сбора диализата (V_{ex}). Объёмы измеряли. Процедуру ПД проводили в «остром» режиме в течение 5 часов подряд. Каждая крыса получала суммарно 6 заполнений брюшного пространства и 6 сливов ультрафильтрации. Величину относительной ультрафильтрации вычисляли по соотношению объёмов V_{ex}/V_{in} по каждому сеансу. Концентрацию изотопа [^{238}U] определяли в суммарном перитонеальном диализате и рассчитывали перитонеальный клиренс урана ($PCI^{[238U]}$) в мкг за 6 сеансов диализа. Рассчитывали Kt/V и URR (доля снижения уровня мочевины, %) для оценки адекватности диализа [Kessler E., 1998].

Коррекцию нарушений КОС проводили на модели отравления ЭГ в дозе 6 мл/кг однократно в/ж. В качестве конкурентного ингибитора алкогольдегидрогеназы животным вводили этанол в виде 30% раствора в дозе 2 мл/кг в/б через 1, 4, 6, 12, 18 ч после отравления по схеме, обеспечивающей его концентрацию в крови не менее 25 ммоль/л [Бонитенко Е.Ю., 2005]. Ацидоз корректировали введением 4% раствора натрия гидрокарбоната в дозе 6 мл/кг три раза в/б в первые сутки после отравления. Диметилсобутилфосфонилдиметилат (ДМФ), 15% раствор, вводили в дозе 150 мг/кг в/б трижды 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 и морфологическим показателям, характеризующими метаболический ацидоз и функции почек.

Нефропротекторная активность. 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 мл/кг) вводили в профилактической схеме в/б крысам за 1 час до введения сулемы (2 мг/кг). 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 совместно с кандидатом медицинских наук Гусейновым Р.Г. Модель интраоперационной ТИП создавали наложением сосудистого зажима на почечную артерию длительностью 30 и 60 минут. После взятия образцов кровотоков по артерии восстанавливали. Конфумин вводили в дозе 1,5 мл/кг внутривенно за 24 и 2 часа до операции. В сыворотке крови и моче измеряли уровень биомаркеров липокалина-2, креатинина, ЛДГ и продуктов липопероксидации.

Физико-химические, молекулярно-биологические и биохимические методы. После введения животным нефротоксинов определяли профиль изменений состава мочи [Reine N.J., 2005; Reagan W.J., 2007]. Физическое исследование суточной мочи животных проводили путём измерения

плотности, электропроводности (ЕС, мкСм/см) и общего содержания солей (TDS, мг/л) [Kitagawa Y.F., 1981; Imran S., 2010]. Осмоляльность оценивали на осмометре OSMOMAT 030 (мОсм/кг).

Концентрацию белка определяли на анализаторе URiСКАН-БК (Эйлитон) методом связывания пирогаллолового красного и креатинина – методом Яффе (мг/дл). Соотношение белок/креатинин (индекс P/C-Ratio) вычисляли расчётным методом. Концентрацию креатинина в крови определяли энзиматическим методом по конечной точке (сыворотка/плазма крови) с погрешностью не более 5% [Greenberg N., 2012]. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле и масс-спектрометрическая идентификация белков мочи. Образцы 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. Гели окрашивали коллоидным раствором Coomassie Brilliant Blue G-250 (чувствительность 1,0 нг белка на бэнд), получали изображения и проводили денситометрический анализ в программе документирования гелей «Chemi Doc MP System» (Bio Rad, США). Для идентификации, выбранные окрашенные зоны ПААГ вырезали, фрагмент геля восстанавливали дитиотреитолом, алкилировали йодацетамидом и расщепляли трипсином. Образцы смешивали с матрицей HCCA (Bruker, 5 мг/мл в 50% ацетонитриле с 0,1% трифторуксусной кислоты), наносили на мишень «Ground Steel» и высушивали. Спектры триптических пептидов регистрировали на MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре «ultrafleXtreme» (Bruker, Германия). 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 Swiss Prot (uniprot.org). Погрешность ограничивали 20 ppm. Идентификацию считали достоверной в случае, если величина Score превышала пороговое значение ($p < 0,05$). Исследование проводили совместно с кандидатом физико-математических наук Забродской Я.А. Для определения ферментов в моче исследования проводили на автоматическом биохимическом анализаторе KeyLab (BPC+Biosed s.r.l.) с использованием наборов реагентов (Randox). Гликозаминогликаны в моче определяли по связыванию с альциановым синим [Chuck A.J., 1986], а коллаген – с сириусом красным [Lageu R.R., 2010]. Результаты соотносили с уровнем креатинина или анализировали абсолютные величины единиц активности [Hofmeister R., 1986; Kocaoglu S., 1997; Inselmann G., 2003; Holdt B., 2008; Quesada A., 2012]. Биомаркеры определяли с помощью следующих наборов методом ИФА: Rat Tissue Polypeptide Antigen (TPA) ELISA Kit (Cusabio); Rat 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). Внутрисерийная воспроизводимость анализа составляла меньше 10%, межсерийная – менее 15%. AMANITINELISA (BühlmannLab. AG). Измерения проводили на спектрофотометре Synergy2 и EPOCH2 (BioTek Instruments Inc.).

Биохимический анализ крови. Кровь получали путём венепункции, из сердца и при эвтаназии. Плазму и сыворотку крови получали после центрифугирования крови при $1,200 \times g$ в течение 5 минут. В образцах сыворотки крови определяли величину pH, уровень натрия, калия, кальция, хлоридов (методом ISE), магния (Thermo Scientific), гидрокарбонатов (DiaSys), лактата (DiaSys), d-3-гидроксибутирата (Randox), альбумина (Randox), мочевины (Randox) и креатинина (Вектор Бест) – на автоматическом биохимическом анализаторе KeyLab (Италия). Рассчитывали концентрационный индекс по креатинину ($KI_{кр}$), анионную разницу ($AP = Na - (Cl + HCO_3)$), ΔpH , ΔAG , ΔHCO_3 , $\Delta AG/\Delta HCO_3$, ΔGap (расчётные параметры). Гомогенаты почек для измерения уровня биомаркеров

готовили на охлаждённом до 0°C 5% хлориде калия в соотношении 1:10. Затем гомогенаты центрифугировали при 10,000×g 5 мин, отбирали супернатант. Определяли уровень общего холестерина, триглицеридов и фосфолипидов общепринятыми методами. Уровень АТФ измеряли фосфоглицераткиназным методом Адамса (1963).

Цитологические методы. Микроскопическое исследование мочевых осадков включало центрифугирование, фиксацию, отмывку, суправитальную окраску и подсчёт клеток. Автоматический подсчёт клеток проводили на анализаторе Fluidlab1Vet (Anvajo). Клетки дифференцировали по их форме, размеру и гранулярности.

Патологоанатомические и гистологические методы. Массовый коэффициент (МК) почек вычисляли при взвешивании почек вместе (мг/г). Проводку и заливку материала осуществляли на автоматическом гистопроцессоре Tissue Tek VP1 (Sakura). Серийные 2-5 мкм срезы окрашивали гематоксилином и эозином, методом PAS, альциановым синим, пикро-сириусом красным, полихромными методами МакФарлана, Фрейзера-Лендрума и Массона [Микроскопическая техника, 1996]. Различение типа канальцев и сосудов проводили с помощью флуоресцентно меченных лектинов LTL-FITC (ПК) и DBA-FITC (ДК и СТ), LEL-TR (сосуды) [Normia M., 1988]. Для исследования на жир криостатные 20 мкм срезы окрашивали 0,2% раствором масляного красного О. Оценивали число клеток поперечного сечения канальцев, содержащих мелкие, средние и крупные капли жира при увеличении 400-1000×, а также соотношение с общим числом клеток сечения канальца. Для визуализации апоптоза срезы окрашивали Hoechst 33342 и актиномицином Д. Оценивали признаки апоптотической смерти клеток по морфологии ядер. Исследование ядер нефротелиоцитов проводили на флуоресцентном микроскопе Leica (Германия). Гистопрепараты исследовали при увеличении 20-1000 крат на светооптическом микроскопе Leica DM1000 (Германия), поляризационном микроскопе Levenhuk 500T, микрофотографии получали с помощью камеры ADFPRO20 и программы ADF Image Capture. Морфометрическое исследование включало в себя полуколичественные оценки и точные измерения [Bohle A., 1987; Klopffleisch R., 2013]. Сумму баллов патологических изменений в ткани почек оценивали по интегральной шкале EGPI-score (от 0 до 4 балла) по методике [Khalid U., 2016]. Вычисление процентной доли структур проводили в программе ImageJ-macros «MRI Fibrosis Tool» (FibrosisTool - ImageJ-macros - MRI's Redmine).

Обработка и статистический анализ результатов. 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 Excel, GraphPad Prism версии 8.0 (США). Значения «нормы» у контрольных животных вычисляли как бисигмальный диапазон Mean±2SD. Проверку на нормальность распределения проводили в тесте Шапиро-Уилка. Коэффициент вариации для внутрисерийных и межсерийных измерений, ROC-анализ (чувствительность и специфичность, дискриминационные характеристики AUC, пороговый уровень cut-off, отношение или коэффициент правдоподобия LR) вычисляли с помощью GraphPad Prism. Положительную и отрицательную прогностическую ценность (%), а также отношение диагностических шансов (DOR) вычисляли согласно рекомендациям [Glas A.S., 2003; Pere M.S., 2004]. Критическим считали DOR≤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 были принят равным 0,05. Для оценки связи двух величин и её направления использовался корреляционный анализ 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). В ряде таблиц представлены $Mean \pm SEM$. Графическое представление результатов статистического анализа приводили на рисунках построением box-plots с 5-95% диапазоном перцентилей; строили графики выживаемости Каплана-Мейера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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 животных моделей является попыткой воспроизвести клиническую ситуацию сопутствующих заболеваний и полипрагмазии, которые лежат в основе патогенеза большинства случаев ОПП [Neuman S.N., 2011]. Наиболее перспективным направлением в решении этой задачи является исследование механизмов альтерации нефротелиоцитов в условиях *in vivo*, которые лишены ограничений для методов *in vitro* и максимально приближаются к клиническим.

Определение этиологического фактора проводили с помощью оценки биомаркеров экспозиции – урана, этиленгликоля, 1,2-дихлорэтана, тетрахлорметана, орелланина, альфа-аманитина. Для ряда веществ проводили только качественное обнаружение и тонкослойную хроматографию. При исследовании токсикокинетики альфа-аманитина – ингибитора РНК-полимеразы 2 типа, методом ИФА было установлено, что после однократного в/б введения экстракта Галерины осенней максимальные концентрации создаются в моче (до 3 суток) и ткани почек (до 4 суток), что коррелировало с гистологическими признаками поражения почек мышей. Наличие нескольких экстремумов концентрации аманитина в крови и печени было обусловлено гепато-интестинальной циркуляцией данного яда и повторным повреждением гепатоцитов. Проведение ранней инфузионной терапии увеличивало перераспределение яда и усиливало поражение почек отравленных мышей: ОПП развивалось на 4 сутки в противоположность группе мышей, которым не проводили инфузионной терапии, у которых развивался панацинарный некроз гепатоцитов на 6-8 сутки отравления. Кинетика содержания орелланина в почках крыс, отравленных экстрактом Паутичника красивейшего, имела две фазы: быстрого (1-48 часов) и медленного (больше 10 суток) снижения. Результаты количественного определения методом ИСП-МС анализа нефротоксичного урана нормализовали к уровню креатинина в моче, кинетика выделения изотопа и его масс-спектр представлены на рисунке 2.

1,2-Дихлорэтан (ДХЭ) при введении в дозе $0,5 \times LD_{50}$ однократно в/ж крысам, был выявлен в моче прямым парофазным методом газо-жидкостной хроматографии с детектором электронного захвата 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). Корреляционный анализ Спирмена показал наличие прямых положительных связей между уровнем ДХЭ в моче и содержанием биомаркера нефротоксичности молекулы-1 повреждения почек ($r_s=0,7427$, 95% ДИ 0,2764-0,9260, $p=0,0083$), а также активностью β -N-ацетилглюкозаминидазы ($r_s =0,8248$, 95% ДИ 0,4613-0,9512, $p=0,0019$) и величиной суммы баллов по шкале EGPI ($r_s =0,8064$, 95% ДИ 0,7126-0,8719, $p<0,0001$).

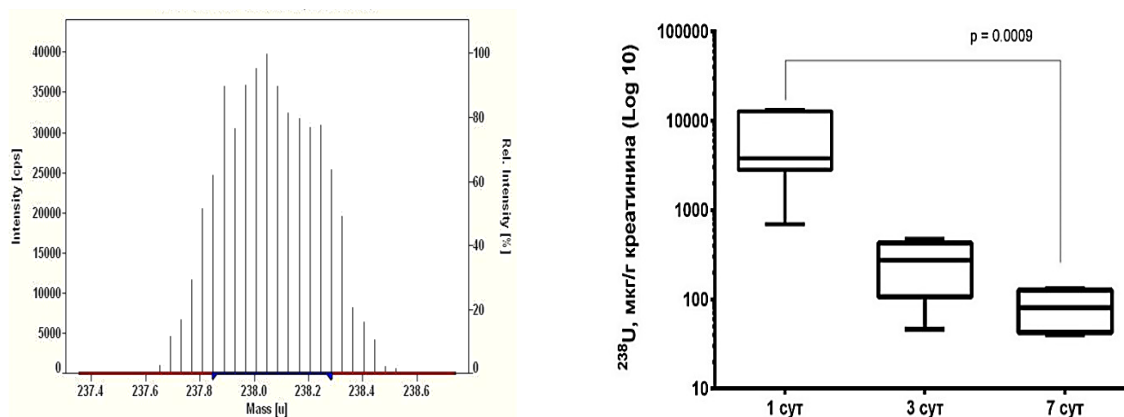


Рисунок 2 – Масс-спектр изотопа урана [²³⁸U] (слева) и кинетика его выведения с мочой у крыс (концентрация, нормализованная к уровню креатинина) при отравлении УАД (справа).

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

Разработка новых критериев оценки развития токсических нефропатий. Непосредственно «мочевыми» биомаркерами поражения почек при отравлениях являются клиничко-лабораторные показатели, в том числе белки из протеома мочи. Протеинурия тубулярного типа является самым характерным критерием развития токсической нефропатии как ОПП ренального фенотипа у самцов и самок [Imafidon E.C., 2016]. Диссертационное исследование показало, что 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 2.

В качестве критерия достоверности протеинурии были рассчитаны величины пороговых (дискриминационных) уровней для самцов и самок крыс, взятых из групп контроля. При действии ядов 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), орелланина (таблица 2). Величина индекса белок-креатинин (P/C-Ratio) увеличивалась от 3 до 7,5 у.е. при отравлении экстрактом Паутинника, дихлорэтаном, уранил ацетатом, трисульфеном и цисплатином. При этом, цисплатин оказал влияние на степень протеинурии только в отношении P/C-Ratio. Циклоспорин А и этиленгликоль у самок крыс не приводили к статистически достоверному увеличению протеинурии. Следовательно, измерение уровня белка и креатинина в моче даёт более точную информацию о нарушении реабсорбции белка проксимальными канальцами при сравнении групп по показателю P/C-Ratio.

Белки мочи 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 (совместно с кандидатом физико-математических наук Забродской Я.А.). 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 фрагментами с другими молекулярными массами. Апробация методического подхода определения некоторых белковых маркеров в моче крыс как метода ранней диагностики токсической нефропатии

была проведена на модели «гентамициновой нефропатии» у крыс обоего пола (гентамицина сульфат, 60 мг/кг, в/м, 5 дней). Было научно обосновано, что для исследования изменения состава протеома мочи под действием нефротоксинов предпочтительно использовать самок животных из-за наличия у самцов базальной высокой протеинурии. Также проводили анализ уропротеинограмм при отравлении другими нефротоксинами до и после очистки и концентрирования образцов. 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.

Таблица 2 – Уровень белка, креатинина и индекс P/C-Ratio в моче у крыс самцов и самок (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: * p<0,05 по сравнению с контролем

Величина внутрисерийного коэффициента вариации для разделения белков мочи крыс «норма» и «патология» методом ЭФ составляла от 5,9 % (при значительных количествах белка в моче) до 11,3 % (при низком содержании белка в моче). Межсерийный коэффициент вариации (CV%) 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 достигал 28-35% для межсерийных сравнений. CV% для тубулярных белков с М.м. 13-24 кДа находился в диапазоне 19,5-43,3%. Также было установлено, что ориентирование по маркерам молекулярной массы является относительным и в процессе масс-спектрометрии истинная масса уточняется. 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 масс-спектрометрического MS2 (MS/MS) анализа была установлена аминокислота М – аланинаминопептидаза (АлАП, цинк-связывающая металлопептидаза), фермент проксимальных канальцев, а уточнённая М.м. составила 109,2 кДа. У крыс самок на фоне введения гентамицина АлАП мочи была обнаружена только на 14-е сутки. В противоположность самкам у самцов АлАП может происходить из простатического сока и давать ложное увеличение активности в моче (относительная экспрессия мРНК по Gene Atlas U133A: АлАП в простате – 1008, в почках – 706,5), что существенно меняет клиническую интерпретацию появления данного маркера в моче в зависимости от пола. 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, альфа-1-антитрипсина в 4,5 раза, бета-2-микроглобулина в 1,5 раза, появлением белков АлАП (на 14 сутки), прекурсоров уромодулина, альфа-1-кислого гликопротеина, снижением уровня трансферрина, в совокупности свидетельствующих о нарушении процессов реабсорбции белков в проксимальных канальцах и секреции в мочу вследствие альтерации нефротелия.

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.

Другим методическим подходом к относительной оценке локализации поражения проксимальных или дистальных канальцев является измерение активности ряда ферментов мочи [Da Silva Melo D.A., 2006]. Три фермента мочи происходят из щёточной каймы ПК-нефротелиоцитов: гамма-глутамилтрансфераза (ГТФ), АлАП и лейцинаминопептидаза, а лактатдегидрогеназа (ЛДГ) и гексокиназа – из клеток ДК. Соотношения активностей ГТФ и ЛДГ были >10 в случае поражения преимущественно проксимальных канальцев или <1 при поражении дистальных канальцев и собирательных трубочек. Нормальные значения должны быть определены для каждой лаборатории чтобы вычислить пороговый уровень. Данные для некоторых лекарственных препаратов с нефротоксическим потенциалом представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Активность ферментов в моче крыс с токсической нефропатией (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: * p<0,05 по сравнению с контролем. Множественные сравнения по тесту Данна.

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. Анализ результатов снижения соотношения ГТФ/ЛДГ мочи подтвердил, что при многократном введении субтоксических доз цисплатина регистрируется поражение ДК и СТ. Патоморфологически у крыс в почках выявили, наряду с интерстициальным нефрофиброзом, формирование кист из атрофичных дистальных канальцев.

Полученные результаты согласуются с тем, что паттерны увеличения ферментов в моче различаются в зависимости от вида нефротоксина [Harauchi T., 1990], а существенные разнонаправленные изменения активности ферментов в зависимости от объема выделяемой мочи

(олигурия или полиурия), не позволяют однозначно трактовать результаты и требуют соотнесения с величиной суточного или минутного диуреза, косвенно – с нарушенной концентрационной функцией почек. Простота измерения активности двух ферментов мочи даёт возможность ориентировочно выявлять локализацию токсической нефропатии до проведения патоморфологического исследования.

Острое токсическое повреждение нефротелия приводит к апоптотической, некроптотической и некротической гибели клеток, которые сопровождаются индуцированным высвобождением цитокинов, хемокинов и АФК, являющихся хемоаттрактантами клеток иммунной системы и «свидетелями» химической травмы при ОПП в моче и крови [Molitoris В.А., 2014; Ермоленко В.М., 2017]. Эти изменения в экспрессии маркеров могут быть детектированы в моче с помощью чувствительного иммуноферментного анализа (ИФА). Детальное исследование с применением методов ИФА, ROC-анализа и оценки прогностической значимости проводили на модели отравления радио- и нефротоксическим соединением урана УАД на крысах, используя 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).

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 [Almufti R., 2014]. Гипотеза заключалась в том, что для раннего распознавания ОПП подходящий биомаркер должен повысить частоту выявления повреждения почек, в идеале в результате своевременного повышения уровня до увеличения уровня креатинина в сыворотке крови. Для достижения такой клинической эффективности необходимо установить пороговое значение, обеспечивающее лучшую чувствительность, чем специфичность (желаемая отрицательная прогностическая ценность >80–95%). Чем выше значение отношения правдоподобия положительного результата теста (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 АUC выше 0,5 и $p < 0,05$. Критерием для определения порога отсечения – дискриминационного уровня (cut-off) выступало требование максимальной суммарной специфичности и чувствительности выше 75% или максимально достижимой.

Для классификации образцов на «здоровые» и «больные» был вычислен cut-off, выше которого расположены все образцы с явной патологией, а ниже – «здоровые». Диапазон cut-off составил в крови: креатинин 87,5-92,5 мкмоль/л; а 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 (RBP) 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. Дискриминационный уровень каждого биомаркера был вычислен для каждой временной точки. Для ряда отобранных маркеров проводили сравнительное исследование на максимальных чувствительности и специфичности (индекс Юдена) cut-off биомаркеров в моче, нормализованных к уровню креатинина мочи, а также уровня креатинина в крови при отравлении различными нефротоксинами. Результаты анализа изменения уровня биомаркеров представлены на рисунке 3 и в таблице 4. Тест Шапиро-Уилка показал, что данные не были нормально распределены, поэтому для сравнения групп применялись непараметрические статистики Краскела-Уоллиса и Данна.

Динамическая оценка 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 бесконечный коэффициент правдоподобия. 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.

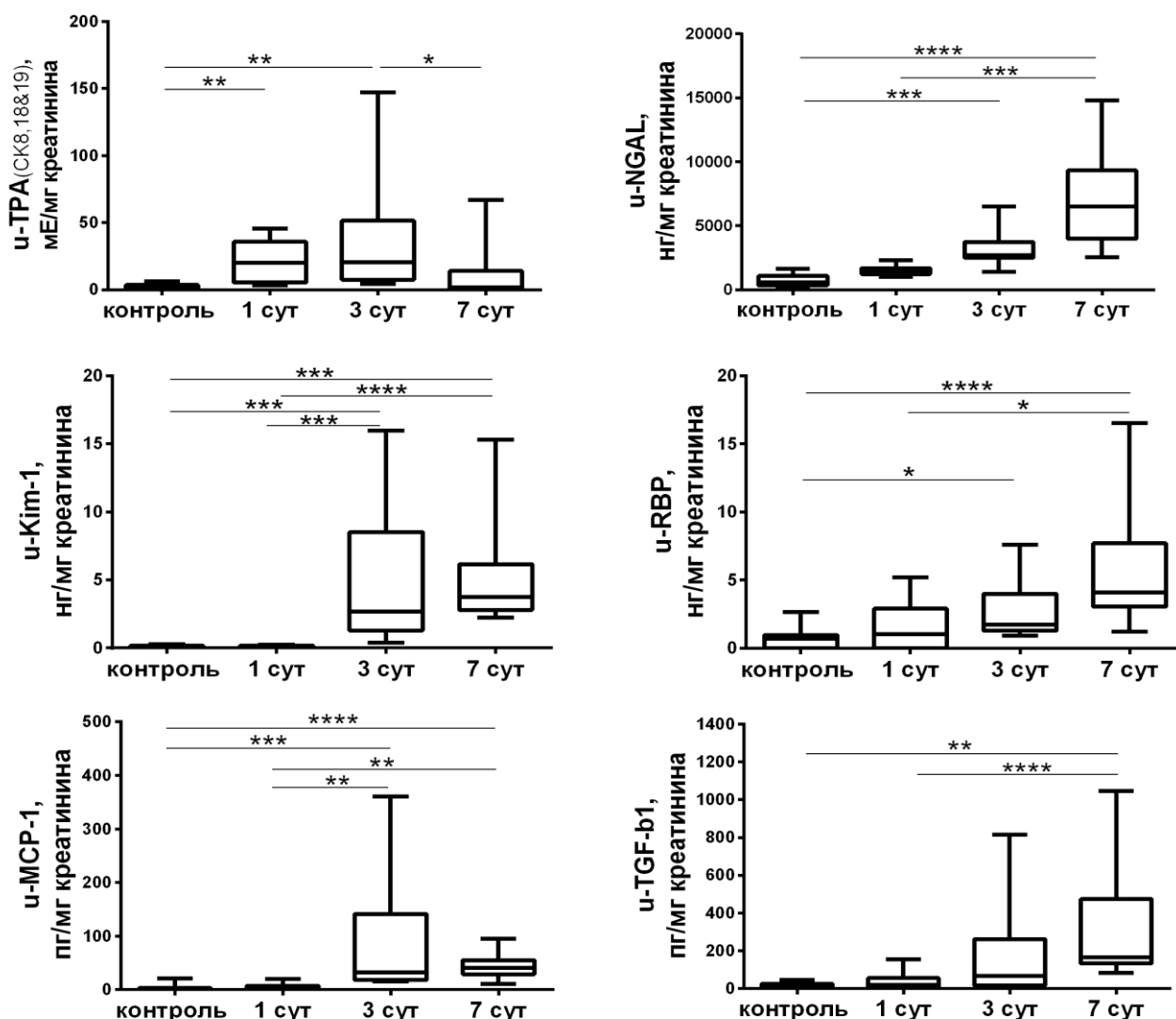


Рисунок 3 – Динамика мочевой экскреции биомаркеров токсической нефропатии (нормализованное к креатинину отношение); множественные сравнения по тесту Данна: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

TPA 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 TPA, 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.

Повышение уровня липокалина-2 в моче выше cut-off у крыс отмечали на протяжении всего срока регистрации. 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 TPA) эксперимента. Значения выше 8,2 нг/мл Kim-1 на 7-е сутки имели положительное прогностическое значение в отношении летального эффекта. Положительная прогностическая ценность Kim-1 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.

Для исследования взаимосвязей между маркерами применялся корреляционный анализ Спирмена, поскольку для всех переменных не выполнялись условия применения корреляционного анализа Пирсона. В контрольной группе и тестовой группе на день 1 статистически значимых корреляций между ненормализованными маркерами не выявлено. 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 ($r_s=0,657$ (95% ДИ 0,134–0,894), $p=0,018$), u-Kim-1 ($r_s=0,804$ (95% ДИ 0,428–0,943), $p=0,001$) и u-MCP-1 ($r_s=0,727$ (95% ДИ 0,263–0,918), $p=0,006$), а также между сывороточным креатинином и u-NGAL ($r_s=0,61$ (95% ДИ 0,055–0,877), $p=0,034$). На день 7 установлена отрицательная корреляция между u-MCP-1 и u-TPA ($r_s=-0,678$ (95% ДИ -0,901–0,171), $p=0,013$) и положительная между u-MCP-1 и u-Kim-1 ($r_s=0,748$ (95% ДИ 0,306–0,925), $p=0,004$).

На день 3 были установлены положительные корреляции между величинами нормализованных по креатинину биомаркеров u-TGF- β 1/креатинин и u-TPA/креатинин ($r_s=0,657$ (95% ДИ 0,134–0,894), $p=0,018$), u-Kim-1/креатинин ($r_s=0,804$ (95% ДИ 0,428–0,943), $p=0,001$) и u-MCP-1/креатинин ($r_s=0,727$ (95% ДИ 0,263–0,918), $p=0,006$), а также между креатинином крови и u-NGAL/креатинин ($r_s=0,61$ (95% ДИ 0,055–0,877), $p=0,034$). На день 7 выявлены отрицательная корреляция между u-MCP-1/креатинин и u-TPA/креатинин ($r_s=-0,678$ (95% ДИ -0,901–0,171), $p=0,013$) и положительная между u-MCP-1/креатинин и u-Kim-1/креатинин ($r_s=0,748$ (95% ДИ 0,306–0,925), $p=0,004$).

Доказана статистически значимая положительная корреляция между уровнем u-TPA/креатинин мочи и суммой баллов по шкале EGPI на 1 сутки ($r_s=0,576$ (95% ДИ 0,003–0,864), $p=0,049$), u-TGF- β 1 и суммой баллов по шкале EGPI на 7 сутки ($r_s=0,582$ (95% ДИ 0,013–0,867), $p=0,046$). Высококвалифицированные 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.

Исследование связи раннего повышения мочевой экскреции тканевого полипептидного антигена, представляющего собой растворимые фрагменты цитокератинов СК8/18 и 19, с уровнем индуцированного апоптоза показало положительную корреляцию и отсутствие связи между концентрацией показателя в моче и риском наступления смертельного исхода. Сравнительный анализ взаимосвязи уровней u-TPA и Kim-1 в моче с долей клеток почек, погибающих по механизму некроза и апоптоза, выявил положительные корреляции Спирмена в парах u-TPA/креатинин – апоптоз ($r_s=0,73$ (95% ДИ 0,45–0,88), $p<0,0001$), u-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.

Таблица 4 – Результаты ROC-анализа биомаркеров в крови и моче (отравление 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	-	97,00	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 положительного результата, p – уровень значимости, s – сыворотка крови, u – моча. Прочерк – данные не рассчитывались на основании низкого уровня AUC

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-TPA-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-RBP-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), $p = 0,0002$.

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 анализата. В перечень маркеров «выбора» следует включать медиаторы дедифференцировки клеток, травмы/некроза почечных канальцев, активации моноцитов/макрофагов, а также функций почек.

Выявленные положительные корреляции между маркерами позволяют исключать дублирующие друг друга тесты при создании мультиплексных панелей для упрощения самого анализа и интерпретации его результатов. Таким образом, трёхточечный кинетический подход измерения уровня биомаркеров с соотношением результатов с величиной пороговых уровней cut-off может быть применён в качестве метода диагностики токсических нефропатий (ранней стадии для регистрации на 1-3 сутки) и оценки ближайших последствий (7-е сутки) острого повреждения почек токсического генеза.

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 (рисунок 4 и 5): 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, лейкоцитурия, гематурия, цилиндрурия, увеличение трансбулярного калиевого градиента (ТТКГ), снижение концентрационного индекса по осмолярности, величины максимальной реабсорбции воды.

В раннем периоде отравления функции почек претерпевают последовательно ряд изменений. Первичные нарушения отмечаются в отношении концентрационной функции и сопровождаются гипо- и изостенурией, относительной полиурией, присоединяются нарушения транспортных систем канальцев за счёт ингибирования процессов реабсорбции. Активация тубулогломерулярной обратной связи приводит в дальнейшем к снижению СКФ для сохранения теряемого с мочой натрия. При воздействии большого числа нефротоксинов прямого типа действия наблюдали независящее от пола нарушение концентрационной функции почек, что характеризовалось развитием полиурии и снижением плотности и общего солесодержания мочи, КИ по осмолярности вследствие нарушения работы транспортных систем тубулоинтерстициального компонента нефронов, а для осмотических ядов (этиленгликоль) – развития онкозиса.

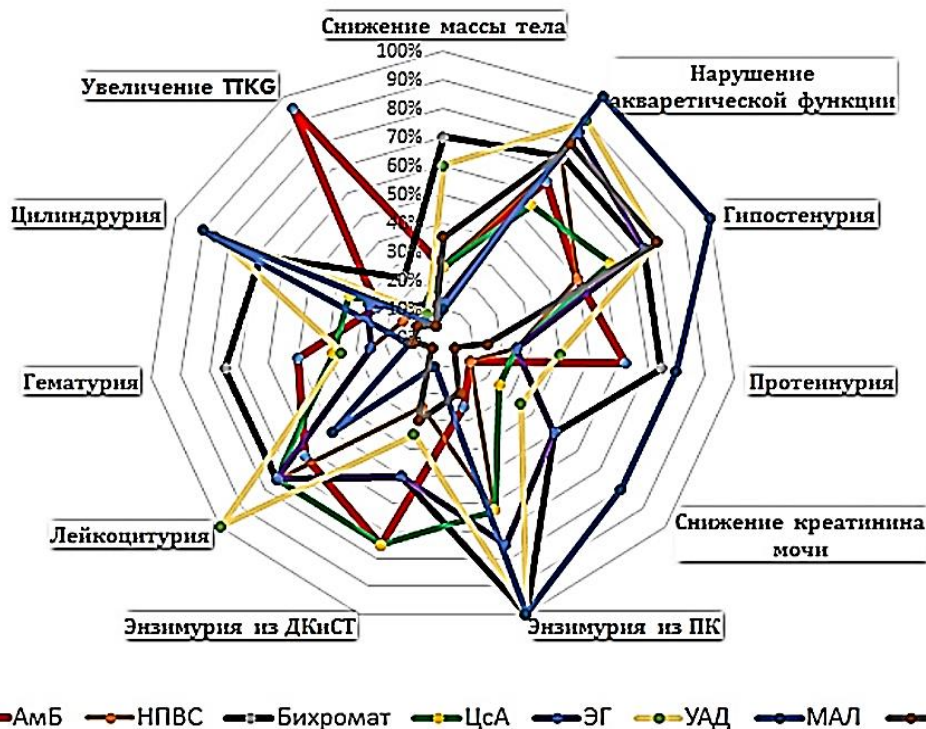


Рисунок 4 – «Паутинная» диаграмма клинико-лабораторных признаков токсической нефропатии у крыс при моделировании отравлений. Обозначения: АмБ – амфотерицин Б, НПВС – нестероидные противовоспалительные средства (ацеклофенак, парацетамол), ЦсА – циклоспорин А, ЭГ – этиленгликоль, УАД – уранил ацетат дигидрат, МАЛ – малеат натрия, СМ – сульфаниламидные препараты.

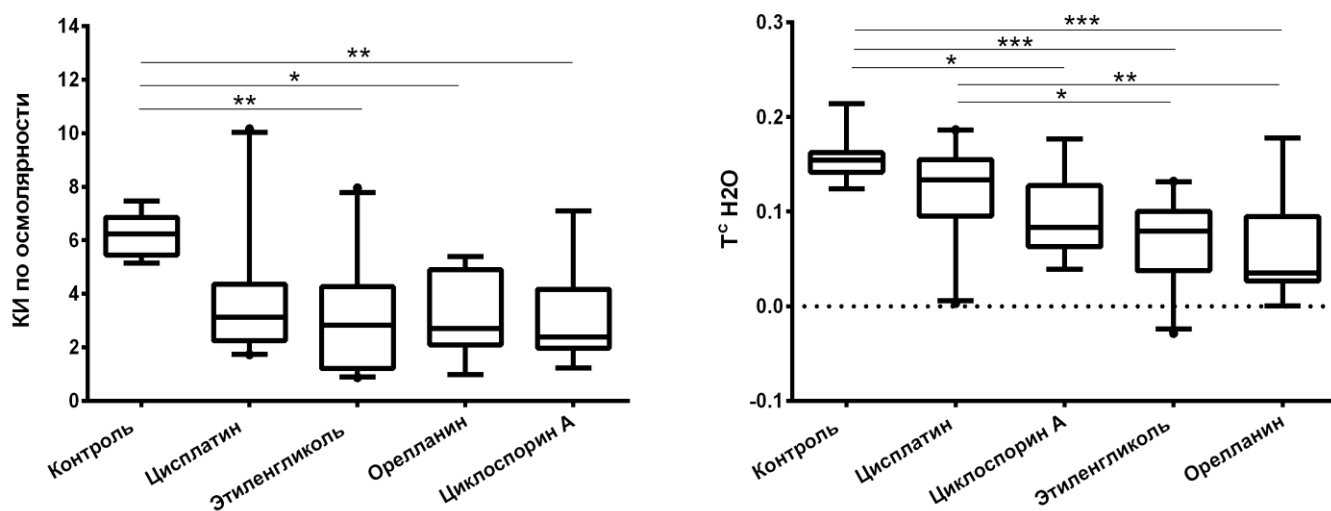


Рисунок 5 – Различия во влиянии ряда нефротоксинов на концентрационный индекс по осмолярности (КИ) и величину максимальной реабсорбции воды ($T^{\circ} H_2O$) у крыс.

Множественные сравнения по тесту Данна: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Для проверки наличия связи между осмоляльностью мочи и высотой нефротелия применялся корреляционный 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), $p<0,0001$. 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. Другие нефротоксины в меньшей степени влияли на величину $FE-Na+$ %. Было установлено, что содержание АТФ в гомогенатах коркового слоя почек крыс с токсической нефропатией существенно снижалось по сравнению с контрольными животными и свидетельствовало о развитии прогрессирующего энергодефицита. 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 (малеат) или 3 (амфотерицин Б) 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.

Анализ полученных данных показал, что при действии нефротоксинов на почки происходит усиленное расходование энергии и формируется тканевой дефицит АТФ, который обуславливает утрату функций почек и гибель клеток, главным образом канальцев.

Снижение массы тела отмечали у животных при отравлении бихроматом калия и УАД из-за их выраженного токсического и катаболического действия. Амфотерицин Б отличался от других веществ существенным влиянием на осмоляльность мочи, трансбубулярный калиевый градиент и энзимию, происходящую из дистальных канальцев. Сульфаниламидные препараты вызывали нарушение водно-выделительной и концентрирующей функции канальцев. Малеат натрия – нарушение, как процессов фильтрации, так и реабсорбции. Острое отравление ЭГ сопровождалось развитием метаболического ацидоза ($\Delta pH=0,47$, анионная разница 31,2 ммоль/л), преимущественно за счёт неизмеряемых метаболитов, а величина ΔGap у отравленных крыс составила 13 ммоль/л, что характерно для смешанного метаболического ацидоза-алкалоза в сочетании с другими обменными нарушениями. Нефротоксическое действие ЭГ характеризовалось нарушением фильтрационной функции почек (в 4 раза, $p=0,005$) с гипокальциемией ($p=0,0076$), связанной с активным потреблением кальция организмом. Для большинства нефротоксинов характерным было преобладание лейкоцитурии над гематурией (за исключением действия бихромата калия), нарушение нескольких функций почек: концентрирующей, акваретической, транспортной, с умеренной протеинурией, энзимиурией проксимального типа, лейкоцитурией и цилиндрурией.

Морфологические изменения почек в диагностике токсических нефропатий. Методология оценки повреждения почек включала в себя следующие гистопатологические приёмы и методы исследования. Алгоритм гистопатологического исследования: макроосмотр, взвешивание почек и осмотр в процессе вырезки/кассетирования образцов (для ОПП характерны: бледность окраски, мраморный рисунок, увеличение линейных размеров почек, сосудистый рисунок), 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 элективной краской или применение других методов (флуоресцентная, поляризационная микроскопия), полуколичественная оценка или морфометрия. 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. Модификация шкалы оценки EGTI по Khalid (2016) включала в себя дополнительную

оценку повреждения стенок сосудов, атрофические изменения нефротелия канальцев и регистрацию интерстициального фиброза. Для локализации и выявления патологических изменений была использована PAS окраска по Шиффу без или с докраской ядер гематоксилином (рисунок 6), 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. У животных из контрольных групп патологические изменения были минимальными или отсутствовали, строение почек не было нарушено. 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 внутрисветовых цилиндров и клеточного дебриса. Гипоксически и токсически изменённые клетки проявляли выраженную фуксинофилию цитоплазмы.

В почках крыс при отравлении этиленгликолем 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 имела диффузный характер с поражением около 1/3 канальцев коркового слоя почек. Некротические изменения эпителия наблюдали в 2/3 канальцев, детритические гомогенные эозинофильные бесструктурные массы были локализованы в просветах повреждённых канальцев. В интерстиции коркового слоя и переходной зоне были отмечены отек и диффузная лимфоплазмочитарная инфильтрация с примесью нейтрофильных гранулоцитов. Применение метода поляризационной микроскопии выявило яркие светящиеся двулучепреломляющие кристаллы в форме вытянутых гирь и октаэдров, соответствующие оксалату кальция, преимущественно локализованные в просвете канальцев (рисунок 7, слева). Патологические изменения в почках свидетельствовали о развитии острого канальцевого некроза в результате осмотического, тубулонекротического действия ЭГ и появления метаболита оксалата кальция. Наличие двояколучепреломляющего материала – кристаллов (в случае отравления этиленгликолем или сульфаниламидными препаратами) выявляли с помощью поляризационной микроскопии, как в ткани почек, так и в препаратах из осадков мочи отравленных животных (рисунок 7, справа). Гиалиновые капли выявляли при окраске парафиновых срезов полихромными методами МакФарлана и Фрейзера-Лендрума (Fraser-Lendrum 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) (рисунок 8). В ряде случаев, на фоне острого некроза канальцев воспалительный инфильтрат интерстиция был выраженным (бихромат калия, уран), минимальным (аманитин) или отсутствовал (ореллантин), что свидетельствовало о чрезвычайной силе яда, ингибировании миграции лейкоцитов (циклофосфамид) (рисунок 8). Динамика лейкоцитарной инфильтрации интерстиция при токсической нефропатии с 1 по 7 сутки у самцов и самок крыс отражён на рисунке 9. Комбинация окраски пикро-сириусом красным и поляризационной микроскопии выявляла зрелость волокон коллагена вокруг поражённых канальцев. Алгоритм патоморфологического изучения почек при токсических нефропатиях представлен на рисунке 10.

При отравлении деструктивным ядом бихроматом калия (15 мг/кг однократно п/к) у крыс на 3 сутки развивался симметричный острый канальцевый некроз (ОКН) всех сегментов проксимальных канальцев. ОКН 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. При отравлении грибными токсинами ОКН был широко распространён в коре (Галерина, Паутинник), а также сопровождался кровоизлияниями с пропитыванием фибрином, ишемией и сдавлением нижележащих структур мозгового слоя (Паутинник).

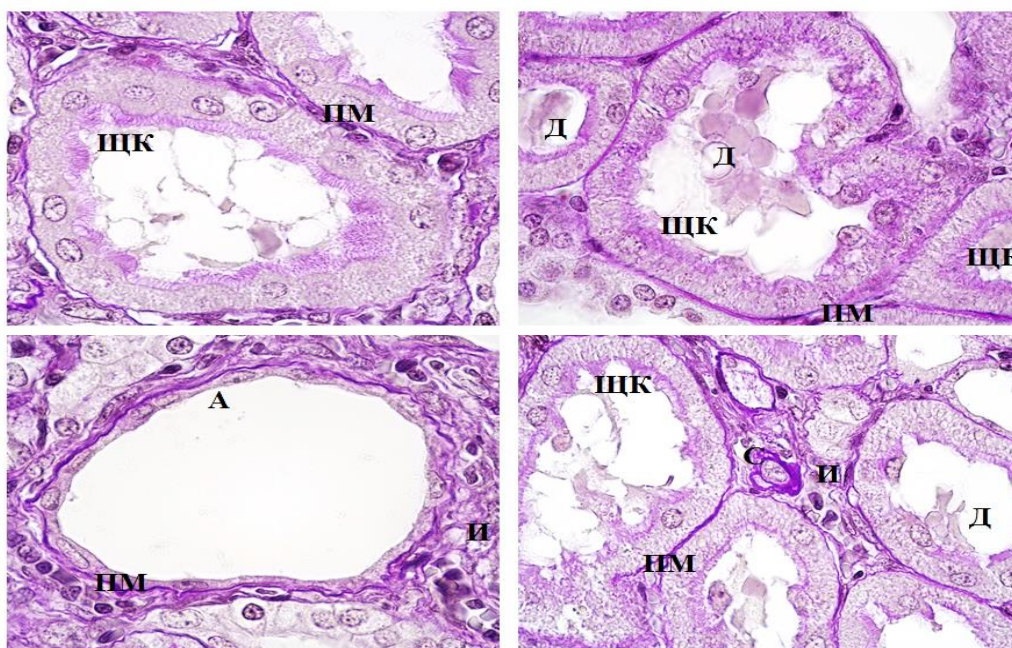


Рисунок 6 – Выявление щёточной каймы нефротелия проксимальных канальцев с помощью PAS окраски. Увеличение 1000. Обозначения: А – атрофия нефротелиоцитов; Д – клеточный дебрис в просвете канальцев; И – интерстиций; С – сосуды; ПМ – перитубулярная базальная мембрана; ЩК – щёточная кайма апикальной мембраны нефротелиоцитов.

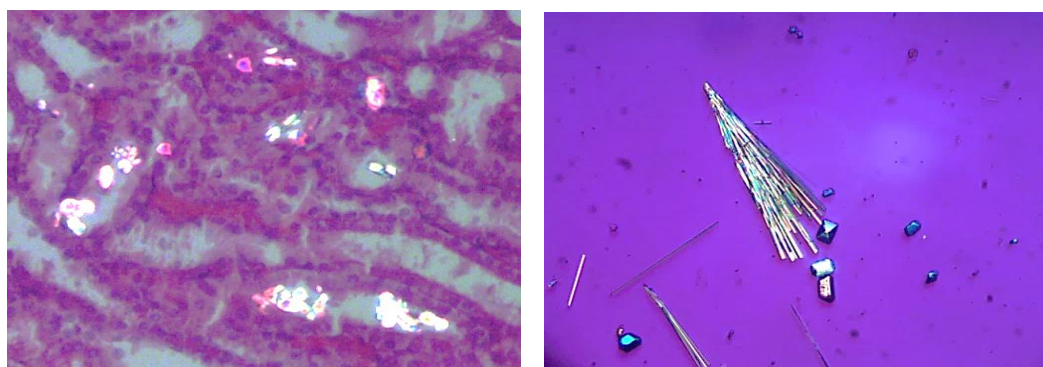


Рисунок 7 – Выявление кристаллов оксалата кальция в проксимальных канальцах при отравлении этиленгликолем (слева) и кристаллов N-ацетил-сульфамометоксина в осадке мочи (справа) методом поляризационной микроскопии. Увеличение 200.

Аналогичные изменения в почках, но с выраженной жировой дистрофией канальцев коркового слоя, были выявлены на модели отравления 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. Гидропическую дистрофию нефротелия ПК вызывали: осмотический яд этиленгликоль и аманигин из яда Галерины осенней (рисунок 8). При гистохимической окраске на жир выявлялись множественные среднекапельные и мелкокапельные

оранжево-красные вакуоли в нефротелии ПК (мертиолят, хлорорганические растворители). При окраске масляным красным О были выявлены крупные ($p=0,0065$) и мелкие ($p=0,0022$) капли жировых включений в цитоплазме значительной части нефротелиоцитов. Преимущество данного красителя заключается в контрастной окраске жировых включений и возможности провести количественное определение на микрофотографиях. При отравлении этиленгликолем и цисплатином отмечали выраженное повреждающее действие на внутрипочечные сосуды в форме отёка, «частокола» эндотелиоцитов, гиалиноза стенки и пролиферации гладкомышечных клеток артериол. Выявленные нами патологические изменения сосудов коркового слоя свидетельствовали о нарушении кровоснабжения обеспечиваемых отделов нефронов, их гипоксии и ишемии.

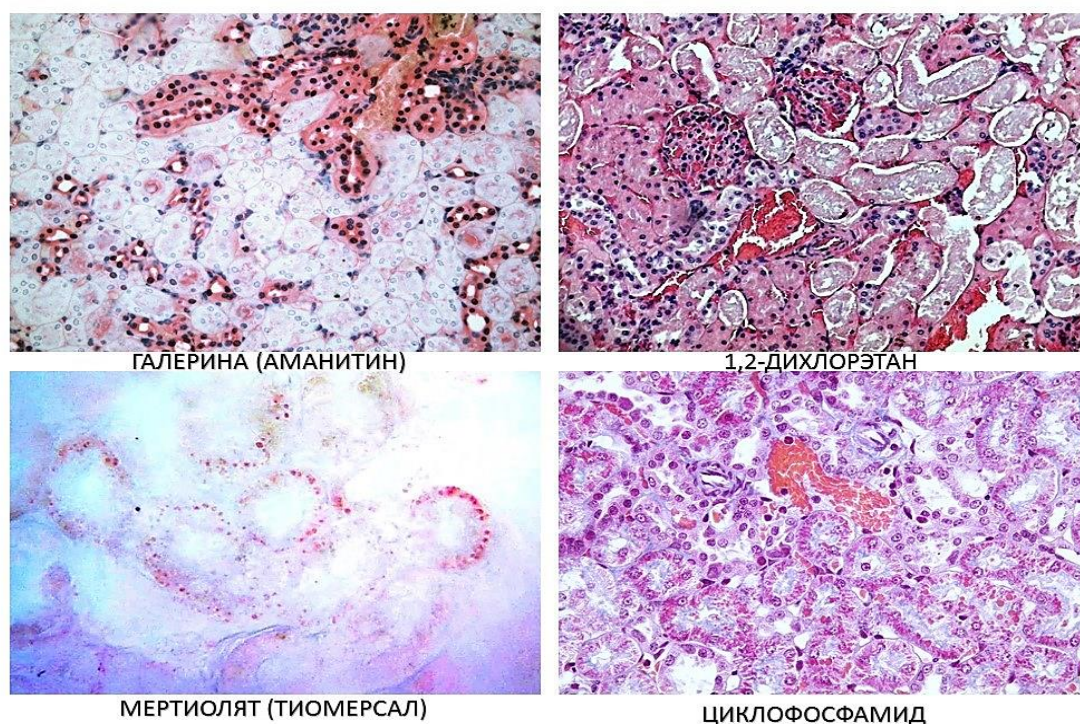


Рисунок 8 – Выявление гидропической дистрофии (отравление аманитином) и острого некроза нефротелия проксимальных канальцев (отравление 1,2-дихлорэтаном) при окраске гематоксилином и эозином. Жировые вакуоли нефротелия (отравление мертиолятом), окраска масляным красным О. Гиалиновокапельная дистрофия нефротелия канальцев, кровоизлияние и периваскулит (отравление циклофосфамидом), окраска по Фрейзеру-Лендруму. Увеличение 200.

Острое повреждение почек типовым радио- и нефротоксином уранил ацетатом дигидратом проявлялось развитием симметричного кортикального некроза с тотальной гибелью органа на 4 сутки, резчайшей ретенционной гиперазотемии, гиперкалиемии, гипермагниемии, наступлением ренопривного терминального состояния к 6-8 суткам. 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. При гистологическом исследовании почек было выявлено расширение просветов капилляров с небольшим эритродиapedезом в коре (диффузно) и мозговом слое с перивазальным отёком внутрипочечных сосудов. В корковом слое установлено: 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 атрофичные каналцы с утолщением базальных мембран каналцев; регенерирующие каналцы с базофилией эпителия и крупными ядрами – на различных этапах прогрессии (по шкале EGTI 1 сут T = 0,87±0,18 самцы, 0,50±0,17 самки; 3 сут T = 2,50±0,29 самцы, 1,40±0,30 самки; 7 сут T = 2,54±0,24 самцы, 2,08±0,31 самки; норма – 0,19-0,90); анизокариоз диффузный в коре с заметными ядрышками и гиперхроматозом. В просвете проксимальных каналцев имелось множество гиалиновых цилиндров и слущенных клеток нефротелия с ядрами и без. Острый некроз каналцев проявлялся увеличением цитоплазматической эозинофилии, набуханием цитоплазмы, потерей щёточной каймы и «пузырением» («блеббинг») на апикальной клеточной мембране, фрагментацией ядер и отслоением некротических клеток в просвет каналцев. 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, в мозговом слое – слабо выраженные. Интерстициальный фиброз не определялся до 7 суток (по шкале EGTI 1 сут I = 0,31±0,11 самцы, 0,20±0,13 самки; 3 сут I = 1,62±0,30 самцы, 0,90±0,28 самки; 7 сут I = 2,08±0,26 самцы, 1,75±0,41 самки; норма – 0,09-0,90). Полученные результаты подтверждали развитие нефротоксического ОПН, неравномерного вследствие завершения начальных стадий повреждения и вторичной альтерации почек, а применение балльной системы оценки по шкале EGTI – объективного перевода качественных признаков в количественные.

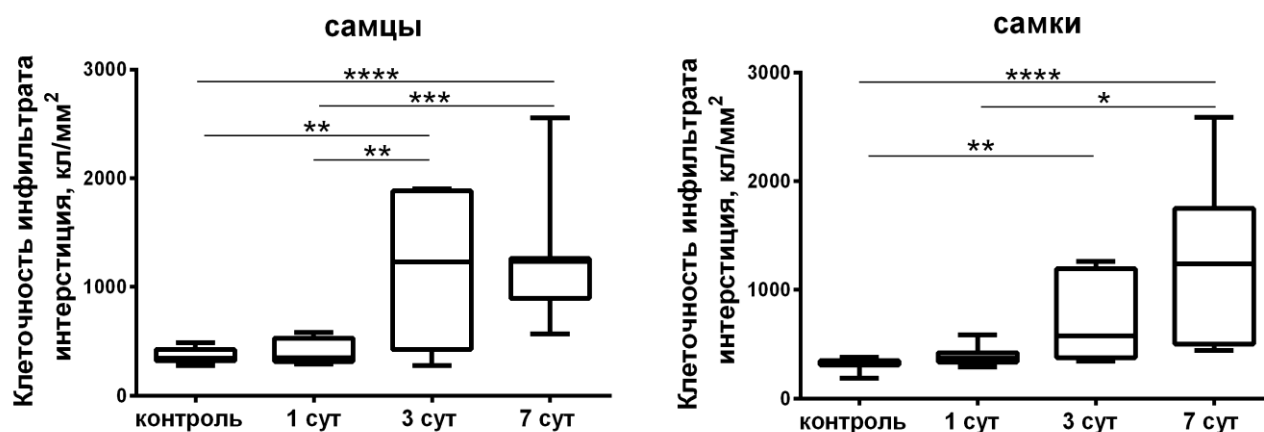


Рисунок 9 – Динамика лейкоцитарной инфильтрации ткани почек крыс обоего пола на различные сроки токсической нефропатии, вызванной УАД. Множественные сравнения по тесту Данна:

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Отсроченную во времени гибель ткани почек выявили при отравлении орелланином. Гистологическое исследование ткани почек крыс было проведено на 1, 2, 5, 7, 10 и 15 сутки после однократного введения экстракта Паутинника. 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. 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 гибель органа, чем существенно отличался от всех других нефротоксинов.

Нефротоксины вызывают локальную гипоксию, связанную с патологией микрососудов почек, которая препятствует восстановлению канальцев, и дедифференцированные нефротелиоциты не могут повторно дифференцироваться и становятся атрофическими. Регенерация нефронов при повторяющихся нефротоксических воздействиях вследствие резорбции яда способствует атипичному её течению – прогрессивному переходу от ОПП к ХБП. Количество клеток проксимальных канальцев с морфологическими признаками апоптоза и некроза максимально увеличивается в ранний период воздействия нефротоксинов (1-3 сут для высоких доз и до 7 сут для низких доз) в интракортикальных нефронах, а в период с 14 по 21 сутки прогрессирует атрофия нефротелия, моноцитарно-макрофагальная и гистиоцитарная инфильтрация, разрастание соединительной ткани вокруг почечных канальцев и сосудов в интерстиции всех зон почек. Последовательное гистопатологическое изучение окрашенных срезов нефробиоптатов методами световой и поляризационной микроскопии (рисунок 10) позволяет идентифицировать общие патологические изменения структур нефронов и выявлять кристаллы токсических веществ и лекарственных препаратов, а также степень зрелости коллагеновых волокон в случае перехода ОПП в ХБП. 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 (нефротоксического), гемодинамического, вакуолярного, миоглобинурического, кристаллического нефрокальцинозного, оксалозного (этиленгликоль), а также интерстициального нефрита и поражения внутривисцеральных сосудов. Используя патоморфологические методы в комбинации «макроосмотр-гистологическое и поляризационно-микроскопическое исследование», возможно установить морфологический вариант ОПП. Результирующий подход к поиску маркеров нефротоксичности и диагностике токсических нефропатий в эксперименте отображён на рисунке 11.

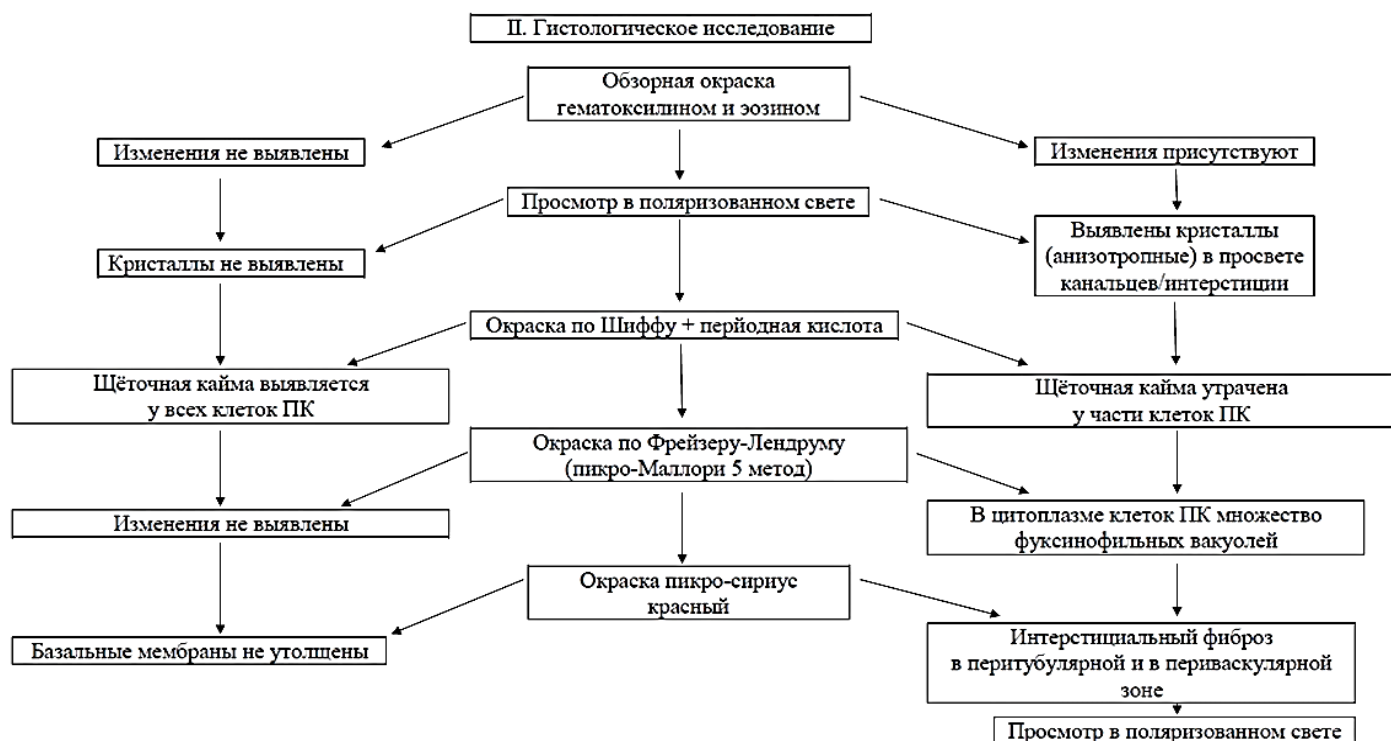


Рисунок 10 – Алгоритм гистологического исследования почек при токсических нефропатиях.

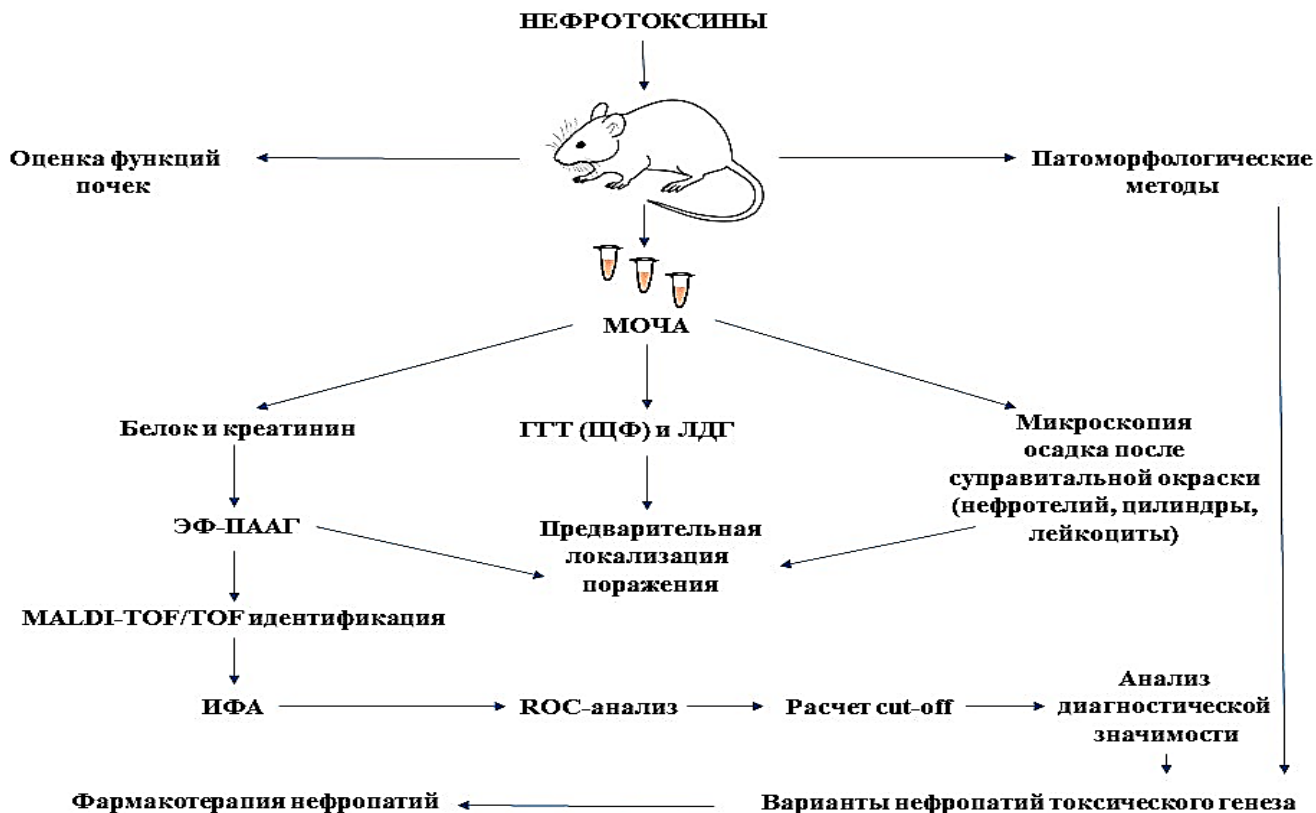


Рисунок 11 – Алгоритм диагностики токсических нефропатий на лабораторных животных с выявлением биомаркеров, микроскопического исследования мочевых осадков и патоморфологического исследования ткани почек.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ФАРМАКОТЕРАПИИ ТОКСИЧЕСКИХ НЕФРОПАТИЙ

Скрининг перспективных средств терапии токсических нефропатий. Для поиска потенциальных нефропротекторных средств применяли технологию тестирования соединений на культуре почечного эпителия в присутствии типового нефротоксина (дихлорида ртути, уранил ацетата, гентамицина сульфата). В качестве кандидатов были выбраны ЛС с нефропротекторным механизмом действия, основанном на данных по первичной и вторичной фармакодинамике, клиническому применению в терапии нефропатологии различного генеза, а также ряда фармакологических зондов – веществ с антигипоксическими и антиоксидантными свойствами, которые могут обладать нефропротекторной активностью. Контрольными (референсными) препаратами служили полигинан (сульфатированный полигалактан-полимер) с М.м. 15-20 кДа и унитиол (димеркаптопропансульфонат натрия) в качестве хелаторов солей ртути. 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. Результаты тестирования ряда фармацевтических субстанций и препаратов *in vitro* показали разнонаправленные эффекты (таблица 5). 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. В отношении сорбции *in vitro* ионов уранила $[UO_2^{2+}]$ энтеросорбенты располагались в ряду кроскармеллоза натрия > полисорб > карболен > цеолит > альгинат натрия + кроскармеллоза натрия > энтеродез > энтеросгель. В отношении сорбции креатинина энтеросорбенты

располагались в ряду карболен > полисорб > кроскармеллоза натрия > альгинат натрия + кроскармеллоза натрия > энтеродез > цеолит > энтеросгель. В отношении сорбции мочевины активными были энтеросорбенты в ряду альгинат натрия + кроскармеллоза натрия > энтеросгель > цеолит.

Впервые было установлено, что селективные и неселективные альфа- и бета-адреноблокаторы и дофамин, 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 триметазида 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 и низкомолекулярные антиоксиданты ресвератрол и 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 счёт «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 натрия, нитрендипин, ресвератрол и мангиферин) и обладающих способностью влиять на системы реабсорбции натрия (индапамид и торасемид). 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 отобранных препаратов проводили тестирование их нефропротекторной активности на модели токсической нефропатии *in vivo*. Результаты представлены в таблице 6.

Сопоставимое нефропротекторное действие в профилактической схеме введения было установлено у животных только для индапамида (2,5 мг/кг), торасемида (10 мг/кг) и конфумина. Нитрендипин (0,5 мг/кг), мангиферин (200 мг/кг), ресвератрол (400 мг/кг) 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. Наибольшим нефропротекторным действием при токсической нефропатии у крыс обладал фумарат натрия (3,5 мл/кг 15% раствора). Фармакопрофилактическое действие фумарата натрия на модели ТИП у кроликов (1,5 мл/кг 15% раствора в/в) выражалось в предотвращении ишемического повреждения паренхимы почек животных, что сопровождалось меньшей степенью изменения биохимических признаков ОПП и накопления продуктов липопероксидации, чем в группах контроля.

Было установлено достоверное снижение уровней липокалина-2, молекулы-1 повреждения почки в крови и моче кроликов, мочевины и креатинина крови, тиобарбитурат-позитивных продуктов, активности лактатдегидрогеназы, клиренса эндогенного креатинина. Высокая концентрация действующего вещества в препарате в отличие от существующих сукцинат- и малат-содержащих инфузионных растворов обеспечивала высокую степень безопасности в отношении риска перегрузки ОЦК вводимым объемом. Полученные результаты свидетельствовали о высокой эффективности и патогенетической обоснованности применения данного препарата в качестве нефропротектора при токсических и ишемических вариантах ОПП.

Таблица 5 – Результаты оценки цитопротекторной активности ряда лекарственных средств *in vitro* на культуре клеток MDCK (тест NRU)

№ пп	Цитопротектор	С, мкг/мл	Токсин: сулема <i>IC</i> ₅₀ мкмоль/л	Среднеингибиторная концентрация (Mean±SEM) в присутствии разведения препаратов (Р / <i>IC</i> ₅₀), мкмоль/л			Соотношение <i>IC</i> ₅₀ с Р / <i>IC</i> ₅₀			Действие нефротоксина
				Р 1:4 – <i>IC</i> ₅₀	Р 1:8 – <i>IC</i> ₅₀	Р 1:16 – <i>IC</i> ₅₀	Р 1:4	Р 1:8	Р 1:16	
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
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
3	Карведилол	200	97,7±1,8	< 10	< 10	< 10	нд	нд	нд	усиливает
4	Доксазозин	50	77,3±1,7	< 10	37,1±1,2	65,8±1,4	нд	0,48	0,85	усиливает
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.
6	Пропранолол	200	77,0±1,8	< 10	< 10	74,2±1,6	0,02	0,02	0,95	усиливает
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
8	Дофамин	200	69,9±1,7	< 10	< 10	< 10	нд	нд	нд	усиливает
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
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
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
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
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.
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
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
16	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
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
18	Унитиол	500	84,0±1,7	245,2±2,9*	156,4±2,7*	122,0±2,1*	2,92	1,86	1,45	ослабляет
19	Растворитель	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

Примечание: *IC*₅₀ – среднеингибиторная концентрация, Р – разведение; С – концентрация маточного раствора цитопротектора; **p*<0,05;

нд – не детектируется

Таблица 6 – Нефропротекторная активность ряда лекарственных препаратов при токсической нефропатии у крыс (дихлорид ртути, 2 мг/кг)

Группы	n	Mean	SD	SEM	95% ДИ	p
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
Фумарат натрия	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
Фумарат натрия	8	919,3	239,4	84,6	719,1-1119,0	0,0022 к ОПП

Примечание: n – выборка; Mean – среднее значение; SD – стандартное отклонение; SEM – ошибка среднего значения; ДИ – доверительный интервал; нс – не существенно. Множественные сравнения по тесту Данна.

Изучение антидотных свойств гидрокарбоната натрия при перитонеальном диализе.

Применение гидрокарбоната натрия в/в при отравлении ураном способствует положительному патоморфозу в почках за счёт уменьшения степени повреждения нефротелия канальцев и регрессии дистрофических процессов. Однако, данный путь применения антидота несёт риск перегрузки ОЦК в условиях ОПП. Гидрокарбонат натрия с соединениями VI-валентного урана образует сверхпрочные по константе стабильности комплексы ($\beta = 1,1 \times 10^{18}$), что представляло выбор данного антидота наиболее оптимальным для проверки его эффективности в режиме назначения при перитонеальном диализе (ПД). Был разработан состав диализирующего раствора (А, аналог дианила) с добавлением гидрокарбоната натрия в качестве антидота (Б) и проведены исследования его стабильности по физико-химическим параметрам и эффективности.

Существенных различий во влиянии растворов А и Б на величину ультрафильтрации (V_{ex}/V_{in} , отн.ед.) по результатам сравнения площадей AUC не было выявлено, за исключением некоторого увеличения на 2 и 3 сеанс в группе крыс с лечением раствором Б ($p=0,026$), что соответствовало большей осмолярности данного состава за счёт включения гидрокарбоната натрия. то есть включение гидрокарбоната не ухудшало мониторируемые параметры эффективности ПД. 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 $PCl[^{238}\text{U}]$ ($p=0,0286$ по критерию Манна-Уитни) по сравнению с раствором А (рисунок 12).

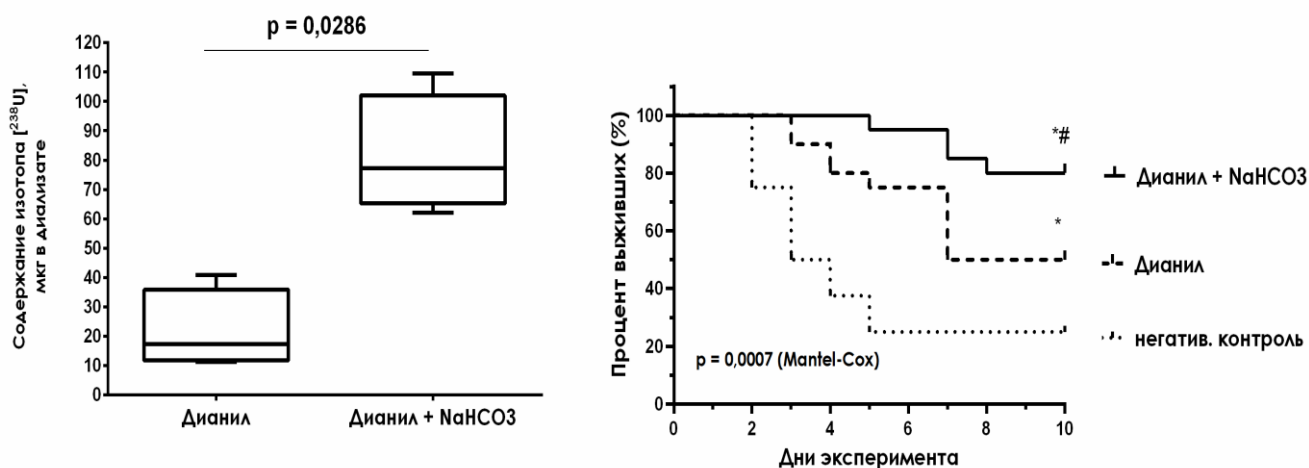


Рисунок 12 – Влияние включения гидрокарбоната натрия в состав диализирующего раствора на перитонеальный клиренс изотопа ^{238}U (слева, тест Манна-Уитни). Графики выживаемости Каплана-Мейера (справа): * $p < 0,05$ по сравнению с негативным контролем; # $p < 0,05$ по сравнению с ПД дианилом.

Результаты теста Мантела-Кокса показали, что терапия ПД с добавлением гидрокарбоната натрия (раствор Б) способствовала достоверному увеличению выживаемости крыс (погибло 20%, $p = 0,0018$ по сравнению с группой негативного контроля, $p = 0,0425$ по сравнению с диализом раствором А).

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 крыс на 276,2%, а также повышению уровня выживаемости отравленных животных. Подобный метод включения антидота в состав диализирующего раствора для проведения перитонеального диализа в современной научной литературе отсутствует.

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

Изучение детоксицирующих свойств диметилксобутилфосфонилдиметилата. На модели острого отравления этиленгликолем (ЭГ) была изучена нефропротекторная активность диметилксобутилфосфонилдиметилата, применяемого для коррекции нарушений КОС в клинической практике при других заболеваниях. Проверка в тесте Шапиро-Уилка показала, что данные не были нормально распределенными, поэтому для сравнения групп применялся непараметрический тест Данна. Результаты отражены в таблице 7.

Стандартная антидтная терапия (САТ) ограничивала развитие гипермагниемии, 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.

Таблица 7 – Влияние диметилксобутилфосфонилдиметилата на биохимические параметры крови крыс при остром отравлении этиленгликолем (описательные статистики Mean±SEM)

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

Примечание: Множественные сравнения по тесту Данна: * p<0,05 по сравнению с группой интактных крыс при; # p<0,05 по сравнению с группой отравленных ЭГ крыс; расчетные параметры КОС и метаболического ацидоза

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 вследствие антиацидотического и мембраностабилизирующего действия. ДМФ существенно ограничивал подъём 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 счёт интенсификации ренального и дыхательного механизмов регуляции КОС. ДМФ ограничивал степень осмотического некроза клеток проксимальных канальцев.

Выявленные эффекты ДМФ превосходили таковые от применения САТ этанолом и натрия гидрокарбонатом, что делает перспективным расширение области применения диметилксобутилфосфонилдиметилата в лечении отравлений ядами, вызывающими метаболический ацидоз с высокой анионной разницей (метанол, ЭГ, салицилаты, нитропруссид натрия).

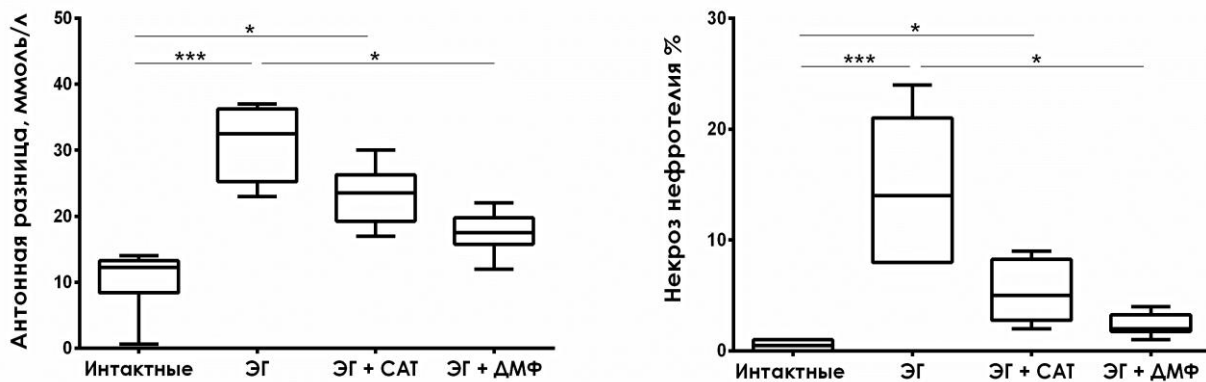


Рисунок 13 – Влияние стандартной антидотной терапии и ДМФ на анионную разницу в крови у крыс (слева) и степень осмотического некроза нефротелиоцитов (справа) при отравлении этиленгликолем. Множественные сравнения по тесту Данна: * $p<0,05$; *** $p<0,001$.

Изучение эффективности фитопрепаратов при токсических нефропатиях. Основные группы биологически активных веществ, обуславливающих нефропротекторную активность фитопрепаратов, составляют антоцианы, иридоиды, органические кислоты (кофейная, розмариновая, фумаровая), полисахариды, флавоноиды. Нефропротекторное действие гранулята композиции экстрактов из *Solidago canadensis*, *Agrimonia eupatoria* и *Bidens tripartita* 66:27:7% (далее ГКЭ, 50 и 100 мг/кг/сут) оценивали на модели цисплатиновой нефропатии. Проверка в тесте Шапиро-Уилка показала, что данные не были нормально распределенными, поэтому для сравнения групп применялся непараметрические статистики Крескела-Уоллиса и Данна. Препарат хофитол из ЛРС артишока *Cynara scolimus* и ГКЭ оказывали позитивное фармакодинамическое действие, которое проявлялось в уменьшении гиперазотемии ($p=0,013$), а также уровня продуктов глубокого окисления белков (АОРР, $p=0,006$), обусловленное входящими в их состав флавоноидами, фенолкарбоновыми кислотами, танинами и тритерпеновыми сапонинами золотарника. При гистологическом исследовании срезов почек крыс было установлено уменьшение степени интерстициального фиброза на 21-45% по сравнению с контрольной группой животных, получавших только цисплатин ($p=0,046$).

По совокупности выявленных позитивных эффектов гранулят композиции экстрактов ГКЭ ограничивал прогрессирование фиброза почечной ткани и снижал интенсивность оксидативного стресса при токсической 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 (таблица 8).

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 лейкоцитарной 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 (в ряду нефрозолид >> хофитол = канефрон Н).

Таблица 8 – Нефропротекторная активность курсового введения фитопрепаратов (60 дней)

Группы	n	Mean	SD	SEM	95% ДИ	p
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.
Нефрозолид	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 u-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.
Нефрозолид	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.
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.
Нефрозолид	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; конт. – контроль патологии; инт. – интактные; МК – массовый коэффициент; p – уровень значимости. Множественные сравнения по тесту Данна.

Анализ результатов экспериментов установил, что новыми патогенетически обоснованными подходами к терапии токсических нефропатий являются: 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; введения в токсикогенную фазу отравления этиленгликолем диметилхлоридфосфонилдиметилата для коррекции метаболического ацидоза с высокой анионной разницей и ограничения поражения почек; введения 15% раствора фумарата натрия в качестве нефропротектора при нефротоксическом ОПП; применения растительных препаратов с нефропротекторными свойствами для ограничения тубулоинтерстициального нефрофиброза при токсических нефропатиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги работы. При решении поставленных в настоящем диссертационном исследовании задач было установлено, что нефротоксический процесс является хемогенным патологическим состоянием, которое свидетельствует о повреждении почек и истощении их клеточных гомеостатических механизмов. При изучении кинетики токсического эффекта было установлено, что в раннем периоде острого повреждения почек токсического генеза «свидетелями» в моче выступают: с высокой диагностической ценностью тканевой полипептидный антиген и

липокалин-2, достоверно увеличивающиеся и выходящие за пределы дискриминационного уровня cut-off. Установлена положительная корреляция между уровнями фрагментов цитокератина 8/18,19 и Kim-1 с долей клеток почек, погибающих по механизму апоптоза и некроза. Превышение дискриминационного уровня в моче биомаркеров u-TPA, u-NGAL, u-KIM-1, u-RBP, u-MCP-1, u-TGF-β1 свидетельствует о развитии токсической нефропатии. Интерпретация результатов оценки токсической нефропатии по экскреции биомаркеров представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Интерпретация результатов оценки токсической нефропатии по результатам анализа кинетики выделения биомаркеров с мочой и креатинина крови

Биомаркеры	Фаза отравления (токсического ОПП)	Клиническое значение
1. cut-off существенно не меняется: биомаркеры повреждения (высокая чувствительность)		
Тканевой полипептидный антиген	токсикогенная и переходная фазы	апоптоз и дедифференцировка нефротелиоцитов
Липокалин-2		ОПП, тубулопатия
Ретинол-связывающий белок	переходная фаза	проксимальная тубулопатия
Моноцитарный хемотаксический белок-1		лейкоцитарная инфильтрация
2. cut-off увеличивается со сменой фаз: биомаркеры функции и прогноза (специфичность)		
Креатинин в крови	переходная и соматогенная фазы	снижение СКФ
Молекула-1 повреждения почки	переходная и соматогенная фазы	ОКН – некроз нефротелиоцитов
Трансформирующий ростовой фактор	соматогенная фаза	регенерация и нефрофиброз

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

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-β1, 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 [²³⁸U] и выживаемость животных; расширение возможностей стандартной антидотной терапии отравлений этиленгликолем с помощью диметилхлоробутилфосфонилдиметилата, 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, нефрозолида, канефрона Н и композиции экстрактов золотарника, рпешка 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 схему 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. Диметилксобутилфосфонилдиметилат 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

НАУЧНЫЕ СТАТЬИ

1. **Сивак К.В.** Методические подходы к доклинической оценке эффективности нефропротекторов / Лесиовская Е.Е., Сивак К.В., Николаев В.О., Сюбаев Р.Д., Верстакова О.Л., Бобылев В.Г., Богданов А.Н. // **Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.** 2007. № 2. С. 91-96.
2. **Sivak K.V.** Nephrotoxicity of extract from fungi *Dermocybe sanguinea* containing anthraquinones / Sivak K.V., Lesiovskaya E.E. // *Itinerary Planner.* Charlotte, NC: Society of Toxicology. 2007. Abstract No 475.
3. **Сивак К.В.** Профилактика аутоенсибилизации, обусловленной воздействием солей ртути в эксперименте / Сивак К.В., Стосман К.И., Рассоха Т.А., Саватеев А.В., Лесиовская Е.Е., Саватеева-Любимова Т.Н. // **Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова.** 2008. № 1 (26). С. 84-87.
4. **Сивак К.В.** Проблемы диагностики и инфузионной терапии отравлений ядовитыми грибами / Сивак К.В., Саватеева Т.Н., Коваленко А.Л., Петров А.Ю. // *Вестник Уральской государственной медицинской академии.* 2009. № 18. С. 82-86.
5. **Сивак К.В.** Проблема нефропатии как побочного эффекта нестероидных противовоспалительных средств: профилактика и коррекция / Сивак К.В., Лесиовская Е.Е. // *Труды Института токсикологии, посвящённые 75-летию со дня основания* // Под редакцией профессора С.П. Нечипоренко. Спб.: ЭЛБИ-Спб, 2010. – С.320 -332.
6. **Сивак К.В.** Биохимическая характеристика поражения почек при остром отравлении солями урана / Сивак К.В., Саватеева-Любимова Т.Н. // **Медицина экстремальных ситуаций.** 2010. № 4 (34). С. 96-104.
7. **Сивак К.В.** Детоксикационные свойства ремаксолола при полиорганной недостаточности на фоне тяжёлого отравления этанолом / Сивак К.В., Саватеева-Любимова Т.Н., Петров А.Ю., Коваленко А.Л. // **Экспериментальная и клиническая фармакология.** 2010. Т. 73. № 12. С. 39-43.
8. **Сивак К.В.** Коррекция синдрома эндотоксикоза, вызванного острым отравлением уксусной кислотой в эксперименте, унифузолом / Саватеева-Любимова Т.Н., Сивак К.В., Стосман К.И., Любишин М.М. // **Вестник Российской Военно-медицинской академии.** 2014. № 4 (48). С. 168-172.
9. **Сивак К.В.** Ренопротекторная активность фумарат содержащего инфузионного раствора при ишемии-реперфузии почки / Попов С.В., Сивак К.В., Гусейнов Р.Г., Борисенко М.Б., Скрыбин О.Н., Яблонский П.К., Виноградова Т.И., Мирзабеков М.М., Сулейманов М.М., Витовская М.Л., Щеголева Р.А., Заболотных Н.В. // **Экспериментальная и клиническая урология.** 2014. № 3. С. 14-18.
10. **Сивак К.В.** Изменения ультраструктурной организации почки в условиях экспериментально смоделированной тепловой ишемии при оперативном вмешательстве / Попов С.В., Гусейнов Р.Г.,

Горшков А.Н., Сивак К.В., Яблонский П.К., Скрыбин О.Н., Виноградова Т.И. // **Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина.** 2016. № 1. С. 104-119.

11. **Sivak K.V.** Efficiency of Canephron N in complex treatment of experimental Heymann glomerulonephritis / Sivak K.V., Lesiovskaya E.E., Stosman K.I. et al. // *Clinical Phytoscience*, 5 (2017). <https://doi.org/10.1186/s40816-016-0021-8>.

12. **Сивак К.В.** Функциональное состояние почек и иммунологические нарушения при остром комбинированном воздействии обеднённым ураном / Сивак К.В., Стосман К.И., Саватеева-Любимова Т.Н. // **Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях.** 2017. № 2. С. 93-98.

13. **Сивак К.В.** Антипротеинурическая и нефропротекторная активность ряда пептидных препаратов при экспериментальной нефропатии / Сивак К.В., Стосман К.И., Саватеева-Любимова Т.Н., Петленко С.В. // *Патогенез.* 2017. Т. 15. № 2. С. 45-51.

14. **Сивак К.В.** Нефропротекторная и антифибротическая активность композиции экстрактов из надземных частей *Agrimonia eupatoria* (Rosaceae), *Bidens tripartita* и *Solidago canadensis* (Asteraceae) при токсических нефропатиях / Сивак К.В., Лесиовская Е.Е., Ожигова М.С., Хаким Э.М., Новикова Е.К. // *Растительные ресурсы.* 2017. Т. 53. № 2. С. 265-283.

15. **Сивак К.В.** Влияние длительности тепловой ишемии почки на восстановление фильтрационной функции в эксперименте / Гусейнов Р.Г., Попов С.В., Горшков А.Н., Сивак К.В., Мартов А.Г. // *Урология.* 2017. № 6. С. 20-29.

16. **Sivak K.V.** TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis / Kuzmich N.N., Sivak K.V., Chubarev V.N., Porozov Y.B., Savateeva-Lyubimova T.N., Peri F. // *Vaccines* (Basel). 2017 Oct 4;5(4):34. Doi: 10.3390/vaccines5040034.

17. **Сивак К.В.** Механизмы нефропатологии токсического генеза // *Патогенез.* 2019. Т. 17. № 2. С. 16-29.

18. **Сивак К.В.** Методические подходы к раннему выявлению острого повреждения почек токсического генеза на основе динамики некоторых биомаркеров / Сивак К.В., Саватеева-Любимова Т.Н., Гуськова Т.А. // **Токсикологический вестник.** 2019. № 2 (155). С. 37-42.

19. **Сивак К.В.** Апробация метода электрофоретического разделения и идентификации некоторых белков мочи у крыс при токсической нефропатии / Сивак К.В., Забродская Я.А., Добровольская О.А. // **Медицинский академический журнал.** 2019. Т. 19. № 3. С. 71-82.

20. **Сивак К.В.** Коррекция нарушений кислотно-основного состояния у крыс при остром отравлении этиленгликолем / Сивак К.В., Любишин М.М., Калинина Е.Ю. // **Медицинский академический журнал.** 2019. Т. 19. № 4. С. 75-86.

21. **Сивак К.В.** Снижение нефротоксичности проведением перитонеального диализа с включением гидрокарбоната натрия при отравлении крыс уранил ацетатом дигидратом / Сивак К.В., Саватеева-Любимова Т.Н., Гуськова Т.А., Гусейнов Р.Г. // **Токсикологический вестник.** 2019. № 6 (159). С. 33-38.

22. **Сивак К.В.** Биологические маркеры и морфогенез острого почечного повреждения при отравлении крыс дихлорэтаном / Сивак К.В., Саватеева-Любимова Т.Н., Гуськова Т.А., Кульбицкий Г.Н., Александрова М.Л. // **Токсикологический вестник.** 2020. № 1 (160). С. 20-26.

23. **Сивак К.В.** Связь уровня цитокератинов СК8/18, 19 и КИМ-1 в моче с апоптозом и некрозом нефротелиоцитов у крыс при токсической нефропатии / Сивак К.В., Гусейнов Р.Г. // **Медицинский академический журнал.** 2020. Т. 20. № 2. С. 17-26.

24. **Сивак К.В.** Нефро- и гепатотоксические эффекты уранила ацетата при хроническом 18-недельном введении крысам / Сивак К.В., Стосман К.И., Саватеева-Любимова Т.Н. // **Токсикологический вестник**. 2021. № 2. С. 51-58.

25. **Sivak K.V.** Evaluation of the diuretic effect of crude ethanol and saponin-rich extracts of *Herniaria glabra* L. in rats / El Mabrouki Hakim, K.V. Sivak, and I.E. Kaukhova // *Journal of ethnopharmacology*. 2021. Vol. 273.P.:113942, doi:10.1016/j.jep.2021.113942

26. **Sivak K.V.** Comparative Study of Sodium Fumarate, Mannitole and Furosemide Concerning Renal Warm Ischemia in Rabbits / Popov S., Guseinov R., Sivak K., Perepelitsa V., Katunin A. // *J Complement Med Res*. 2021; 12(3): 144-152. Doi:10.5455/jcmr.2021.12.03.19

ПАТЕНТЫ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

1. **Патент РФ № 2561295**. Способ моделирования комбинированного воздействия обеднённым ураном. Сивак К.В., Саватеева-Любимова Т.Н., Стосман К.И., Наволоцкий Д.В., Любишин М.М. Патент на изобретение RU 2561295 С1, 27.08.2015. Заявка № 2014126141/14 от 26.06.2014.

2. **Патент РФ № 2676696**. Способ фармакологической защиты почечной ткани при лапароскопической резекции почки. Попов С.В., Гусейнов Р.Г., Скрыбин О.Н., Сивак К.В., Орлов И.Н., Емельяненко А.В. Патент на изобретение RU 2676696 С1, 10.01.2019. Заявка № 2018104644 от 06.02.2018.

МОНОГРАФИИ

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

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АлАП	–	аланинаминопептидаза
АР	–	анионная разница
АТФ	–	аденозинтрифосфорная кислота
ВОЗ	–	Всемирная организация здравоохранения, WHO
в/в	–	внутривенно
в/ж	–	внутрижелудочно
в/м	–	внутримышечно
ГКЭ	–	гранулят композиции экстрактов
ГТФ	–	гамма-глутамилтрансфераза
ДИ	–	доверительный интервал
ДК	–	дистальные канальцы
ДМФ	–	диметилноксобутилфосфонилдиметилат
ДХЭ	–	дихлорэтан-1,2
ИФА	–	иммуноферментный анализ, ELISA
кДа	–	килодальтоны
КИ	–	концентрационный индекс
КОС	–	кислотно-основное состояние
ЛДГ	–	лактатдегидрогеназа
М.м.	–	молекулярная масса
НПВС	–	нестероидные противовоспалительные средства
ОКН	–	острый канальцевый некроз
ОПП	–	острое повреждение почек, АКІ – acute kidney injury
ОЦК	–	объем циркулирующей крови
ПААГ	–	полиакриламидный гель

ПД	–	перитонеальный диализ
ПК	–	проксимальные каналцы
п/к	–	подкожно
РЗЭ	–	редкоземельные элементы
САТ	–	стандартная антидотная терапия
СКФ	–	скорость клубочковой фильтрации, GFR
СТ	–	собирательные трубочки
ТИП	–	тепловая ишемия почки
УАД	–	уранил ацетат дигидрат
ФС	–	фармацевтическая субстанция
ХБП	–	хроническая болезнь почек
ЩФ	–	щелочная фосфатаза
ЭГ	–	этиленгликоль
АОРР	–	продукты глубокого окисления белков
AUC	–	площадь под кривой
Сl	–	клиренс
Cut-off	–	дискриминационный уровень, пороговое значение, точка отсечения
CV%	–	коэффициент вариации
d-3-НВА	–	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
EGTI	–	шкала состояния эндотелий-клубочки-каналцы-интерстиций
FE-Na%	–	фракционная экскреция натрия
IC ₅₀	–	средняя ингибиторная концентрация
Kim-1	–	молекула-1 повреждения почки
Kt/V	–	диализная доза
LD	–	летальная доза (средняя – 50%, абсолютная – 100%)
LR	–	коэффициент правдоподобия положительного результата
MCP-1	–	моноцитарный хемоаттрактантный белок-1, CCL2 (C-C motif ligand 2)
Mean	–	среднее (арифметическое) значение
NGAL	–	липокалин-2, ассоциированный с нейтрофильной желатиназой
NRU	–	тест захвата нейтрального красного
p	–	уровень значимости
PAS	–	окраска периодной кислотой и фуксином по Шиффу
P/C-Ratio	–	индекс белок/креатинин мочи
PCl [²³⁸ U]	–	перитонеальный клиренс изотопа урана ²³⁸ U
pH	–	водородный показатель
r	–	коэффициент корреляции (s – Спирмена)
RBP	–	ретинол-связывающий белок
ROC	–	кривая бинарной классификации чувствительности и специфичности
SD	–	стандартное отклонение
SEM	–	ошибка среднего значения
Tc H ₂ O	–	величина максимальной реабсорбции осмотически свободной воды
TGF	–	трансформирующий ростовой фактор
TPA	–	тканевой полипептидный антиген, цитокератины 8,18 и 19
TTKG	–	транстубулярный калиевый градиент
URR	–	фракционное снижение мочевины во время диализа
V ex/in	–	величина относительной ультрафильтрации