



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

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

пр. Гореза, д. 44, г. Санкт-Петербург, 194223  
тел.: 552-79-01, факс: 552-30-12  
e-mail: office@iephb.ru, http://www.iephb.ru  
ОКПО 02698559, ОГРН 1027801535728  
ИНН/КПП 7802038273/780201001

26.09.2022 № 1/598

На №

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИЭФБ РАН  
доктор биологических наук,  
член-корр. РАН

М.Л. Фирсов



«26» 09 2022 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости диссертации  
Сивака Константина Владимировича «ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ  
НОВЫХ ПОДХОДОВ К ДИАГНОСТИКЕ И ФАРМАКОТЕРАПИИ ТОКСИЧЕСКИХ  
НЕФРОПАТИЙ», представленной на соискание ученой степени доктора биологических  
наук по специальности 3.3.4. Токсикология

**Актуальность темы диссертационной работы и ее связь с соответствующими  
отраслями науки и практической деятельности.**

Смертность от неумышленных и умышленных отравлений в Российской Федера-  
ции, к сожалению, превышает среднемировой уровень. Острые экзогенные отравления  
системными ядами, лекарственными средствами с нефротоксическим потенциалом, при-  
родными нефротоксинами, а также веществами, вызывающими рабдомиолиз, вызывают  
развитие ренального фенотипа диффузного двустороннего острого повреждения почек  
(ОПП), а также быть причиной тубулоинтерстициального нефрита (ТИН) с исходом в  
нефрофиброз (ТИФ) или нефрогенный системный фиброз. ОПП токсического генеза обу-  
словливает высокий риск летального исхода и требует незамедлительной терапии, при  
этом важнейшей мерой профилактики развития фатальных последствий является ранняя  
диагностика. Следовательно, экспериментальное обоснование новых подходов к диагно-  
стике нефропатий токсического генеза и расширение возможностей антидотной и деток-  
сикационной терапии является **своевременным и актуальным исследованием**, имею-  
щим чрезвычайно важное социально-экономическое значение.

Вх. № 34

«10» сентября 2022 г.

ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России  
Диссертационный совет

Диагностика токсических нефропатий основывается на совокупности клинических признаков и результатов лабораторных исследований. Для достижения клинической эффективности и окончательного диагноза необходимо установить пороговое значение уровня биомаркеров с высокой положительной и отрицательной прогностической ценностью. Однако работ, оценивающих кинетику выделения маркеров с мочой для диагностики и прогноза течения нефропатий токсического генеза, в научной литературе крайне мало. Более того, для некоторых биомаркеров различия значений, полученных с использованием различных антител от разных производителей или с применением разных технологических платформ, составляют 10-15 раз, а если к этому добавить общую недостаточность данных по самкам, то необходимость дальнейших исследований становится очевидной. Несмотря на существование в настоящее время довольно большого количества биомаркеров поражения почек, недостатками являются невысокая специфичность рутинных биохимических маркеров, высокая стоимость антител для исследования маркеров с более высокой специфичностью, различия стандартов диагностики в разных странах. Кроме того, анализ существующих подходов к проблеме показал, что нет единых критериев оценки степени и характера повреждений почек различными по месту действия нефротоксинами. Это не позволяет оптимизировать профилактику, неотложную и реабилитационную терапию токсических поражений почек. Многофакторный характер этиологии и патогенеза ОПП, функциональная неоднородность различных сегментов нефрона препятствуют достижению клинических успехов. 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.

#### **Научная новизна исследования и полученных результатов.**

Автором диссертационного исследования впервые предложен метод диагностики токсических нефропатий на основе кинетического подхода измерения уровня биомаркеров тканевого полипептидного антигена, липокалина-2, молекулы-1 повреждения почки, ретинол-связывающего белка-4, моноцитарного хемотаксического белка-1, трансформирующего ростового фактора бета-1 в моче. На лабораторных животных с использованием кинетического подхода оценки экскреции биомаркеров установлена последовательность развития острого поражения почек. Установлено наличие взаимосвязи между уровнями тканевого полипептидного антигена и молекулы повреждения почек 1 (Kim-1) в моче с долей клеток почек, погибающих по механизму апоптоза и некроза при токсической нефропатии. Обоснована связь между уровнями биомаркеров и патоморфологическими

изменениями в почках лабораторных животных. Предложен способ повышения эффективности перитонеального диализа с использованием гидрокарбоната натрия при остром отравлении соединениями урана. Доказана нефропротекторная активность диметилхосбутилфосфонилдиметилата при введении в токсикогенную фазу острой интоксикации этиленгликолем, 15%-го раствора фумарата натрия при токсическом и ишемическом остром повреждении почек, а также растительных фитопрепаратов хофитол, нефрозолид, канефрон Н и композиции экстрактов золотарника, репешка и череды на экспериментальных моделях токсических нефропатий.

### **Значимость результатов, полученных автором диссертации, для науки и практики.**

Автором диссертационного исследования обоснован новый подход к диагностике нефропатий токсического генеза, предложены способ ускорения выведения урана из организма посредством перитонеального диализа и способ коррекции диметилхосбутилфосфонилдиметилатом метаболического ацидоза с высокой анионной разницей, доказана эффективность ренопротекторной терапии фумаратом натрия и фитопрепаратами. Автором впервые применены методы биоинформатического анализа в виде принципов поиска закономерности изменения уровня биомаркеров от времени и технологии расчётов. Установлено, что в начальном периоде ОПП токсического генеза свидетелем повреждения канальцев нефронов выступает ранее не идентифицированный как маркер нефротоксичности тканевой полипептидный антиген (фрагменты цитокератина 8/18,19), наряду с известным биомаркером липокалином-2. Выявлены гистоморфологические параметры оценки сосудисто-гломерулярного и тубулоинтерстициального компонентов повреждения нефронов для идентификации морфологического варианта ОПП. Обосновано использование самок крыс для исследования изменений состава протеома мочи под действием нефротоксинов, ввиду низкого базального уровня выделения белка, доминирующим компонентом которого являются фрагменты лёгких цепей иммуноглобулинов. Трёхточечный кинетический подход измерения уровней биомаркеров, разработанный диссертантом, демонстрирует большую чувствительность и специфичность, прогностическую значимость и опережает диагностику по росту сывороточного креатинина, поэтому может быть использован для ранней диагностики токсической нефропатии, что также позволит определять направление течения ОПП. Применение комплекса методов химико-токсикологического, клинико-лабораторного, инструментального исследования способен обеспечить значительный социально-экономический эффект в связи со снижением инвалидизации, обусловленной ранним началом специфической терапии, и сокращению потерь от нетрудоспособности

населения Российской Федерации. Предложенный подход диагностики нефропатий токсического генеза является универсальным и может быть распространён на ОПП различного генеза. Для практического применения разработаны и опубликованы методические рекомендации для врачей, опубликована монография, посвящённая проблеме острой ишемии почек, издано руководство, в котором отражены современные представления о месте фитотерапии в стандартах лечения наиболее широко распространённых заболеваний почек и мочевыводящих путей.

### **Структура и содержание работы.**

Диссертация изложена на 282 страницах и состоит из введения, основной части, включающей аналитический обзор, материалы и методы исследования, 2 главы с материалами собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений и список литературы. Диссертация включает 40 таблиц и 63 рисунка. Список литературы содержит 619 источников литературы, в том числе 79 отечественных.

Первая глава работы посвящена обзору литературы по проблеме исследования. Диссертант изложил современные представления о токсических нефропатиях, описал эпидемиологию, этиологию и патогенез нефропатий токсического генеза, современные методы изучения нефротоксичности и методы терапии нефропатий токсического генеза.

В главах с материалами собственных исследований автор сначала изложил экспериментальное обоснование новых подходов к диагностике токсических нефропатий, которые включают в себя разработку новых критериев оценки развития токсических нефропатий, описание функциональных и морфологических изменений почек при диагностике токсических нефропатий. Затем произведено экспериментальное обоснование патогенетической фармакотерапии токсических нефропатий, которое включает в себя результаты скрининга перспективных средств терапии токсических нефропатий, результаты изучения антидотных свойств гидрокарбоната натрия при перитонеальном диализе, результаты исследования детоксицирующих свойств диметилкобобутилфосфонилдиметилата и результаты изучения эффективности фитопрепаратов при токсических нефропатиях. В главе Обсуждение результатов проведен обстоятельный анализ изложенных данных собственных исследований с учетом литературных данных, изложенных в обзорной части. На основании Обсуждения сформулировано Заключение, в одном из подразделов которого обозначены **перспективы дальнейшей разработки темы**. Следует отметить, что этот небольшой по объему подраздел является весьма важным, т.к. позволяет связать текущую работу диссертанта с его пониманием развития данного направления науки и соответствующими

планами дальнейших научных исследований. В частности, диссертант не собирается останавливаться на достигнутом и планирует поиск других чувствительных биомаркеров, а также поиск новых лекарственных средств и антидотов в составе диализирующих растворов.

### **Обоснованность используемых методов, а также полученных результатов и положений диссертации.**

В диссертационном исследовании были применены главным образом нефротоксиканты прямого типа действия, которые исследовали в экспериментах *in vitro* и вводили лабораторным животным с целью моделирования токсического поражения почек. Изучение *in vitro* проводили на монослойной эпителиальной культуре гипердиплоидных клеток MDCK (CCL34, почка Спаниеля), клеток LLC-MK2 (CCL7, почка обезьяны), являющихся модельными культурами клеток почечного эпителия. Оценку токсичности испытуемых веществ и влияние нефропротекторов проводили методом NRU, который основан на способности живых клеток поглощать краситель нейтральный красный. Апоптоз клеток оценивали по степени деградации хроматина.

При работе с животными все яды – типовые нефротоксины применяли в «токсических» ( $1 \times LD_{50} - LD_{100}$ ) и «субтоксических» ( $\leq 1 \times LD_{50}$  при многократном введении) дозах. В работе были использованы мыши линии *C57BL/6J*, крысы белые беспородные, линии *Wistar*, *Sprague-Dawley* и кролики-самцы породы Советская шиншилла. Применяли токсикологические, химико-токсикологические, физиологические и фармакологические методы исследования, физико-химические методы исследования мочи, методы молекулярно-биологического и гистологического исследования. Математические преобразования проводили путём вычисления концентрационных индексов, нормализованного отношения (к креатинину), соотношения величин активности ферментов, логарифмирования – в программах Microsoft Excel, GraphPad Prism. Статистический анализ выполняли с использованием GraphPad Prism 8. Результаты, полученные в ходе исследования, обработаны с применением современных методов статистики, что дало возможность автору получить объективную и достоверную информацию, а также аргументированно и убедительно обосновать научные положения, выводы и практические рекомендации, изложенные в диссертации. Выводы и практические рекомендации логично вытекают из основных положений работы, в полной мере отражают основные результаты выполненного исследования, полностью соответствуют поставленным задачам.

Диссертация изложена хорошим профессиональным и литературным языком. Автореферат диссертации Сивака К.В. на тему «ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ

НОВЫХ ПОДХОДОВ К ДИАГНОСТИКЕ И ФАРМАКОТЕРАПИИ ТОКСИЧЕСКИХ НЕФРОПАТИЙ» полностью соответствует содержанию диссертационной работы и оформлен в соответствии с предъявляемыми требованиями. В нем отражено содержание исследования и полученные результаты. Выводы, представленные в автореферате, полностью соответствуют таковым, приведенным в диссертации.

#### **Замечания и вопросы по диссертационной работе.**

Замечаний принципиального характера по содержанию диссертационного исследования К.В. Сивака нет. В автореферате некоторые аббревиатуры не вынесены в список сокращений (напр., ТИФ) и даже используются без предварительной расшифровки (напр., ТИН), тогда как другие вводятся неоднократно (напр., DOR). О тенденции в статистике, тем более об «отчетливой тенденции», можно говорить в случае  $0,05 < p < 0,1$ , но никак не в случае, когда  $p = 0,1337$ . Аббревиатура ГТФ используется биохимиками исключительно по отношению к гуанозинтрифосфату, тогда как по отношению к гамма-глутамилтрансферазе принято использовать аббревиатуру ГГТ.

Кроме того, имеются грамматические, стилистические и терминологические погрешности. Отметим те из них, которые связаны с профессиональной терминологией и вызывают соответствующие вопросы.

1) Автор использует термины «токсическая» и «субтоксическая» дозы, подразумеваемая при этом дозы преимущественно летальные. Следует понимать, что токсическая доза – это количество вещества, вызывающее различной степени выраженности патологические изменения в организме, т.е. это понятие охватывает как летальные, так и сублетальные дозы, причем с акцентом на последние. В то же время, известно, что сублетальная доза – это доза токсиканта, которая вызывает серьезное нарушение жизнедеятельности организма без смертельного исхода.

2) В диссертационной работе часто встречаются термины «диагностическая или прогностическая **ценность**», тогда как в медико-биологической русскоязычной литературе принято говорить и писать «диагностическая или прогностическая **значимость**», что является переводом англоязычного «diagnostic/prognostic **value**». Слово «value» переводится как «ценность» в смысле либо технического, либо социально-экономического.

В контексте данного замечания возникли вопросы. Предложенный диссертантом комплекс выявляемых в моче биомаркеров (тканевый полипептидный антиген, липокалин-2, молекула-1 повреждения почки, ретинол-связывающий белок-4, моноцитарный хемотаксический белок-1, трансформирующий ростовой фактор бета-1) несомненно обладает более высокой диагностической значимостью, но какова цена вопроса, производилась

ли сравнительная оценка «удельной стоимости» традиционного и нового алгоритма диагностики, включающего в себя стоимость коммерчески доступных препаратов, приборов для измерения всех вышеуказанных биомаркеров и оплату квалифицированного персонала, производящего измерения и интерпретацию результатов? Насколько оправданы повышенные затраты применительно к диагностике токсических нефропатий? В каких лабораториях каких ведомств предполагается внедрение данного диагностического комплекса? Или речь идет о его применении в уже существующих и технологически оснащенных диагностических центрах?

3) Автор часто употребляет термины «нефротелиоциты» и «нефротелий», подразумевая при этом клетки почечного тубулярного эпителия, который выстилает проксимальные и дистальные извитые каналцы. «Нефротелиоциты» и «нефротелий» являются устаревшими терминами и в современной литературе (как русско-, так и англоязычной) практически не встречаются. Более того, ввиду существенных морфофункциональных отличий клеток проксимальных и дистальных каналцев в научных публикациях необходимо всегда уточнять, о каком из двух типов эпителия идет речь.

4) Неудачным представляется употребление термина «деструктивный» применительно к конкретному яду (бихромат калия). Напрашивается существование некоего «конструктивного яда», но более важным является то, что в существующих в токсикологии классификациях ядов (по происхождению, типу действия и др.) нет такого понятия «деструктивный». Аналогично, этиленгликоль не является «осмотическим» ядом, как утверждается в диссертации. Этиленгликоль считается нейроваскулярным или протоплазматическим ядом, токсическое действие которого включает в себя осмотическую компоненту и реализуется продуктами его метаболизма, т.е. это еще и пример «летального синтеза».

5) Если говорить о деструктивности яда в широком смысле слова, то она проявляется в гибели клеток и организма, причем не всегда первое предшествует второму. **В связи с этим вопрос.** В диссертации в контексте механизмов гибели клеток упоминаются некроз, апоптоз и целый ряд других вариантов трансформации клеток, как то: дедифференцировка, дистрофические изменения, нефрофиброз и эпителиально-мезенхимальный переход 2 типа. Если с апоптозом и некрозом все более или менее понятно, то как соотносятся между собой, с одной стороны, и с гибелью клеток, с другой стороны, перечисленные варианты трансформации клеток?

Указанные замечания и недостатки не снижают общую положительную оценку диссертации, тогда как заданные вопросы могут послужить предметом для дискуссии или для дальнейших научных исследований диссертанта.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Сивака Константина Владимировича «ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ НОВЫХ ПОДХОДОВ К ДИАГНОСТИКЕ И ФАРМАКОТЕРАПИИ ТОКСИЧЕСКИХ НЕФРОПАТИЙ», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.3.4. Токсикология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научно-практическая проблема, имеющая существенное значение для токсикологии, а именно: экспериментально обоснованы новые подходы к диагностике патологии почек при отравлении веществами нефротоксического действия и определены перспективные направления антидотной и детоксицирующей терапии токсических нефропатий.

Диссертационная работа Сивака К.В. полностью соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 3.3.4. Токсикология.

Отзыв заслушан, обсужден и одобрен на заседании лаборатории сравнительной биохимии ферментов Федерального государственного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН), протокол №5 от 21 сентября 2022 г.

Главный научный сотрудник, зав. лабораторией сравнительной биохимии ферментов,

доктор биологических наук

Н.В. Гончаров

Подпись д.б.н. Гончарова Н.В. заверяю:

Ученый секретарь ИЭФБ РАН, к.б.н.

Е.И. Гальперина

« 26 » 09 2022 г.

### СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Полное название: Федеральное государственное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

Сокращенное название: ИЭФБ РАН.

Адрес: 194223, г. Санкт-Петербург, просп. Тореза, д.44.

Телефон: (812) 552-7901, факс: (812) 552-3012

e-mail: office@iephb.ru <http://http.www.iephb.ru/>