

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, доцента, ведущего научного сотрудника 2 управления научно-исследовательского испытательного центра (медико-биологической защиты) Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации Никифорова Александра Сергеевича на диссертацию Сивака Константина Владимировича на тему: «Экспериментальное обоснование новых подходов к диагностике и фармакотерапии токсических нефропатий» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.3.4. Токсикология.

**Актуальность темы диссертационного исследования.** В настоящее время токсическое поражение почек представляет собой одну из актуальных проблем в современной нефрологии. Согласно статистике число отравлений химическими веществами синтетического и природного происхождения, а также лекарственными препаратами сохраняется на высоком уровне, большинство из которых оказывают как прямой так и опосредованное токсическое действие на выделительную систему и почки. Широкое использование веществ и препаратов, обладающих нефротоксичностью, способных вызывать гемодинамические нарушения и оказать прямое негативное действие на органы мочевой системы, приводит к нарушению функционального состояния почек различной степени тяжести. Нередко токсическое поражение почек сопровождается развитием острого повреждения почек (ОПП), которое на фоне нефротоксического воздействия токсикантов, играет ведущую роль в прогрессировании стойких нарушений функции почек и, зачастую, определяет прогноз. При этом в большинстве случаев установить этиологический фактор поражения почек не представляется возможным ввиду несовершенных технологий выявления и регистрации, несогласованных диагностических критериев и неспецифических клинических проявлений некоторых форм отравлений.

Вх. № 33

«10» октября 2022 г.

ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России

Диссертационный совет

В экспериментальной и клинической практике широко исследуются ранние маркеры ОПП в сыворотке и в моче, к которым относятся Kim-1 (молекула повреждения почки) и липокалин-2. Установлено, что мочевого Kim-1 значительно повышается при остром канальцевом некрозе и ОПП. При этом ОПП, индуцированное действием нефротоксикантов, является фактором риска развития серьезных осложнений. Однако данных о пороговых значениях биомаркеров повреждения почек, а также данных о их кинетике, которые позволили бы повысить эффективность диагностики и прогноза течения нефропатий в настоящее время крайне мало.

Несмотря на большое количество исследований, направленных на поиск эффективных нефропротекторов и средств антидотной терапии токсических нефропатий, наиболее эффективными методами медицинской помощи в неотложной форме при ОПП считаются: гемодиализ, гемосорбция и фильтрация, а также перитонеальный диализ. В настоящее время разработана и широко применяется в клинической практике медикаментозная терапия ОПП, однако она зачастую не учитывает этиологический фактор отравления и в ряде случаев оказывается недостаточно эффективной, что препятствует достижению клинических успехов.

В связи с вышеизложенным цель данного диссертационного исследования, состоящая в экспериментальном обосновании новых подходов к диагностике патологии почек при отравлении веществами нефротического действия и перспективных направлений антидотной и детоксицирующей терапии токсических нефропатий, является актуальной.

**Научная новизна полученных результатов.** Автором 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, а также 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 повреждения почки (Kim-1) в моче с долей клеток почек, погибающих по механизму апоптоза и некроза при токсической нефропатии. Обоснована связь между уровнями биомаркеров и патоморфологическими изменениями в почках лабораторных животных. Впервые предложен способ повышения эффективности перитонеального диализа с использованием в составе диализирующего раствора гидрокарбоната натрия при остром отравлении соединениями урана, увеличивающего перитонеальный клиренс изотопа [ $^{238}\text{U}$ ] и выживаемость животных.

Установлено, что диметилноксобутилфосфонилдиметилат 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.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна.** Диссертационное исследование построено методически правильно, объем исследования достаточен для формулирования статистически обоснованных заключений. Исследование выполнено на обширном экспериментальном материале. Работа грамотно спланирована, проведена с использованием современных токсикологических, физиологических, фармакологических, биохимических и аналитических методов. Набор выбранных методов исследований соответствует современному методическому уровню экспериментальных исследований, что существенно увеличивает степень обоснованности доказанности научных положений, выводов и практических рекомендаций. Положения, вынесенные на защиту, аргументированы и обоснованы, отражают актуальность и существо

проблемы, изложенной в материалах диссертации, характеризуются достоверностью и новизной, статистической значимостью. В ходе работы автором проанализировано большое количество отечественных и зарубежных источников, отражающих современное состояние проблемы по теме диссертации. Полученные результаты экспериментальных исследований подтверждены современными методами статистического анализа с использованием различных критериев описательной и аналитической статистики.

Материалы диссертации доложены и широко обсуждены на научных и научно-практических конференциях и съездах международного и российского уровня. По теме диссертационного исследования опубликовано 42 научные работы, из них 15 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования результатов исследований, выполненных на соискание ученой степени доктора биологических наук, в том числе по профилю специальности 3.3.4. Токсикология. Получено 2 патента на изобретение РФ. Разработаны и опубликованы методические рекомендации для врачей ФМБА России МР № 12.29-15 «Оценка возможности развития последствий острого и пролонгированного воздействия ураном», а также монография «Тепловая ишемия почки» и руководство «Доказательная фитотерапия. Руководство для врачей и провизоров».

Полученные в ходе исследования материалы внедрены в медицинскую и научно-исследовательскую деятельность СПб ГБУЗ «Клиническая больница Святителя Луки», а также при проведении оперативного лечения рака почки (акт внедрения от 05.05.2022 № 02-359/22-0-0), в учебную работу на кафедре военной токсикологии и медицинской защиты ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ (акт внедрения от 27.03.2022) и используются для проведения лекционных и семинарских занятий у ординаторов, обучающихся в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России по специальности 31.08.35 в части реализации рабочих программ по дисциплинам «инфекционные болезни»,

«клиническая фармакология» и «патология» (акт внедрения от 01.09.2021 № 763/1).

**Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации.** Теоретическая значимость работы заключается в экспериментальном обосновании нового подхода к диагностике нефропатий токсического генеза, способа ускорения выведения урана из организма посредством перитонеального диализа, а также коррекции диметилноксобутилфосфонилдиметилатом метаболического ацидоза, ренопротекторной терапии фумаратом натрия и фитопрепаратами. Впервые автором проведено научное обоснование применения метода биоинформатического анализа в виде принципов поиска закономерности изменения уровня биомаркеров от времени и технологии расчётов. На основании сравнительных исследований при токсических нефропатиях были отобраны гистоморфологические параметры оценки сосудисто-гломерулярного и тубулоинтерстициального компонентов повреждения нефронов для идентификации морфологического варианта ОПП.

Разработанный автором трёхточечный кинетический подход измерения уровней биомаркеров может быть использован для диагностики токсической нефропатии, который по сравнению с уже известными методами диагностики токсических нефропатий обладает большей чувствительностью и специфичностью и позволяет выявлять ранние фазы ОПП. 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.

Практическая значимость диссертационной работы, определяется тем, что полученные результаты могут быть использованы при дальнейшем изучении патогенеза токсических нефропатий, механизмов нефротоксичности новых химических веществ и лекарственных препаратов, а также при разработке новых подходов к диагностике и терапии нефропатий токсического

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

Диссертационная работа Сивака Константина Владимировича представлена в традиционной форме и изложена на 282 страницах и содержит 40 таблиц и 63 рисунка. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, состоящий из 79 отечественных и 540 зарубежных источников.

Во введении автором обоснована актуальность темы диссертационного исследования, сформулирована цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, приведены положения, выносимые на защиту, подробно описана апробация и внедрение результатов исследования.

В обзоре литературы автор рассматривает современные представления о токсических нефропатиях, эпидемиологии, этиологии и патогенезе нефропатий токсического генеза. Подробно описаны современные экспериментальные и клинические методы диагностики и исследования нефропатий токсического генеза, а также терапия лекарственными средствами синтетического и растительного происхождения.

Во второй главе описаны методы исследования, включающие моделирование токсического поражения почек (токсичные металлы, металлоорганические и фосфорорганические соединения, технические жидкости, лекарственные препараты и токсины грибов), а также физиологические, фармакологические, химико-токсикологические, молекулярно-биологические, биохимические и патоморфологические методы изучения токсических нефропатий и эффективности средств профилактики и неотложной терапии. Представленные математико-статистические методы

обработки экспериментальных данных позволили установить высокую значимость полученных результатов.

Третья глава посвящена экспериментальному обоснованию и разработке новых подходов к диагностике токсических нефропатий. Полученные автором результаты позволили установить, что при разработке диагностического алгоритма ОПП целесообразно определять массовое содержание токсиканта в биологических жидкостях (кровь, моча). Установлено, что в раннем периоде ОПП токсического генеза в качестве специфичных маркеров повреждения почек следует рассматривать тканевой полипептидный антиген и липокаин-2, а также цитокератин 8/18,19 и Kim-1.

Выявлены диагностически значимые функциональные и морфологические изменения почек при токсическом повреждении. Показано, что на фоне отравления нарушается работа транспортных систем нефрона, а также выявляется утрата щеточной каймы, конденсация хроматина и дистрофические изменения клеток проксимальных канальцев. Совокупность выявленных изменений позволила автору сделать предположение, что при токсических нефропатиях развивается симметричная гетерогенная тубулоинтерстициальная патология почек, а также интерстициальный нефрит и поражение внутрпочечных сосудов. На основании проведённых исследований автором предложена схема диагностики экспериментальной токсической нефропатии и алгоритм макроскопического и гистологического исследования почек при токсических поражениях.

В четвертой главе представлены экспериментальные исследования перспективных средств терапии токсических нефропатий в опытах *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что наибольшей нефропротективной активностью при профилактическом введении крысам на фоне введения дихлорида ртути обладал фумарат натрия, индапамид и торасемид. Также показано, что фумарат натрия способствовал достоверному уменьшению уровня липокалина-2 и Kim-1 по сравнению с группой контроля. Автором показано, что применение инфузионных растворов недостаточно эффективно и зависит от токсиканта, а применение энтеросорбентов требует поиск более

индивидуальных подходов к их назначению. Также показано, что гидрокарбонат натрия повышает эффективность перитонеального диализа при остром отравлении нефротоксичными соединениями урана. При отравлении этиленгликолем высокую эффективность отмечали при применении димефосфона, за счет антиацидотического и мембраностабилизирующего действия препарата. На модели нефропатии, вызванной введением цисплатина наибольший эффект отмечен при курсовом применении экстракта золотарника – нефрозолит и гранулят композиции экстрактов.

Каждая из глав собственных исследований резюмируется обобщением полученных результатов, где автор, кратко излагает итоги выполненного исследования.

В пятой главе и заключении автор, с учетом данных литературы, обобщает полученные результаты. Выводы диссертационной работы логично вытекают из результатов проведенных автором исследований и полностью раскрывают полученные данные, соответствуют цели и задачам исследования и имеют научное и практическое значение. Автором предложены перспективы дальнейшей разработки темы и практические рекомендации по использованию результатов диссертационной работы.

В диссертационной работе соискатель ученой степени ссылается на конкретных авторов и источники заимствования материалов и отдельных результатов. При использовании в диссертации результатов научных работ, выполненных соискателем в соавторстве, Сивак Константин Владимирович отмечает это обстоятельство.

**Соответствие автореферата содержанию диссертации.** Автореферат изложен на 48 страницах и достаточно полно отражает содержание диссертации. В нем содержатся сведения об актуальности изучаемой проблемы, научной новизне, теоретической и практической значимости работы, материале и методах исследования, основных результатах с их обсуждением, а также выводы, практические рекомендации и список работ, опубликованных автором по теме диссертационного исследования.



При ознакомлении с диссертацией и авторефератом возникли следующие замечания:

1. В обзоре литературы автором подробно описан патогенез и современные методы диагностики и лечения токсических нефропатий, при этом мало уделено внимания обоснованию выбора токсикантов и препаратов, которые автор исследует в своей работе.

2. В рисунках и таблицах, в ряде случаев отсутствует информация о сроках исследования, дозах и путях введения изучаемых веществ и препаратов, что затрудняет интерпретацию представленных данных. В некоторых таблицах указано, что сравнение проведено с данными животных контрольной группы, при этом представлены результаты только интактных крыс.

3. В материалах и методах, а также главах собственных исследований количество изучаемых химических веществ и лекарственных препаратов различается.

4. В задачах и в положениях, выносимых на защиту не в полной мере нашли отражение результаты исследования эффективности лекарственных препаратов для терапии поражений почек при отравлении тяжелыми металлами, при этом в результатах собственных исследований представлен достаточно большой объем экспериментального материала.

Высказанные замечания не снижают общей положительной оценки работы, вместе с тем, хотелось бы, чтобы в рамках научной дискуссии автор диссертации ответил на следующие вопросы:

1. На основании каких результатов экспериментальных исследований сделано заключение, что гидрокарбонат натрия представляет собой антидот при острых отравлениях соединениями урана, учитывая, что в работе не представлены его защитные характеристики (индекс защиты, антидотная мощность и др.)?

2. В диссертационном исследовании автор использует экстракты грибов, полученные методом перколяции 50 % этанолом, содержащие в своем составе кроме основных действующих веществ, высокомолекулярные соединения и

белки, которые при системном введении также могут оказывать нефротоксическое действие. Можно ли достоверно утверждать, что ОПП было обусловлено именно действием орелланина и аманитина?

3. Почему в главе 4.1 лекарственные препараты вводили животным профилактически, если в работе разрабатывали терапевтическую схему токсических острых повреждений почек?

4. Какова частота отравлений в Российской Федерации ацетонитрилом? Зачем исследовали эффективность инфузионных растворов при отравлении ацетонитрилом?

5. Почему для изучения нефропротективной активности лекарственных препаратов *in vivo* была выбрана только модель острого повреждения почек, опосредованная введением дихлорида ртути?

6. Фитопрепараты исследовали на модели токсической нефропатии, вызванной цисплатином и дихлоридом ртути, а будут ли они эффективны на других моделях острого повреждения почек?

**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 завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основе выполненных автором исследований решена научная проблема диагностики и экспериментальной терапии патологии почек при отравлении веществами нефротического действия, которая позволит оптимизировать и повысить эффективность профилактической, неотложной и плановой медицинской помощи при токсических поражениях почек.

По своей актуальности, объему выполненных исследований, научной новизне, методическому уровню, теоретической и практической ценности полученных результатов, обоснованности и достоверности научных положений и выводов диссертационная работа Сивака Константина Владимировича соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением

Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 26.05.2020 г. № 751, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Сивак Константин Владимирович, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по научной специальности 3.3.4. Токсикология.

Официальный оппонент

Ведущий научный сотрудник 2 управления научно-исследовательского испытательного центра (медико-биологической защиты) Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации доктор биологических наук (3.3.4 – токсикология), доцент

А.С. Никифоров

«12» сентября 2022 г.

Подпись доктора биологических наук, доцента Александра Сергеевича Никифорова заверяю.

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации доктор медицинских наук



А.В. Степанов

«12» сентября 2022 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации  
195043, Россия, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4  
Тел. (812) 775-02-64  
Адрес электронной почты: gniiivm\_15@mil.ru