

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**им. М.В. Ломоносова**

**НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского**

*на правах рукописи*



**Брезгунова Анна Александровна**

**Изучение механизмов острого почечного повреждения и подходов к  
нефропротекции при ишемии почки и системном воспалении**

**Специальность - 1.5.5. Физиология человека и животных**

**Диссертация на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук**

**Научные руководители:**

**Плотников Егор Юрьевич,**

*доктор биологических наук, профессор РАН*

**Певзнер Ирина Борисовна,**

*кандидат биологических наук*

**Москва – 2025**

## Содержание

Содержание.....	2
Список сокращений.....	5
<b>1. ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>8</b>
<b>2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>18</b>
2.1. Острое почечное повреждение .....	18
2.1.1 Понятие, критерии, эпидемиология и этиология ОПП .....	18
2.1.2 Диагностические маркеры ОПП. ....	20
2.1.3 Основные звенья патогенеза ОПП.....	21
2.1.4. Роль воспаления в патогенезе и разрешении ОПП.....	28
2.1.5. Развитие ОПП при системном воспалении.....	32
2.2. Экспериментальное моделирование ОПП .....	35
2.2.1. Признанные модели ОПП.....	35
2.2.2. Модель фототромбоза мозга как основа для создания новой модели повреждения почек.....	37
2.3. Терапевтические подходы к лечению ОПП. ....	40
2.3.1. Профилактика и симптоматическая терапия ОПП. ....	40
2.3.2. Возможные подходы терапии ОПП.....	42
2.3.3. Подавление воспаления как стратегия терапии ОПП .....	44
2.3.4. Влияние синаптамида на воспаление .....	46
<b>3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>49</b>
3.1. Содержание, уход за животными .....	49
3.2. Моделирование повреждения почек.....	49
3.2.1. Фототромбоз почки - новая экспериментальная модель ОПП .....	49
3.2.2. Ишемия/реперфузия почки и терапия синаптамидом .....	51
3.2.3. ЛПС-индуцированное ОПП .....	52

3.3. Клинические данные пациентов.....	52
3.4. Диагностика ОПП .....	53
3.5. Микро-КТ.....	54
3.6. Тест на жизнеспособность клеток.....	54
3.7. Оценка проницаемости сосудов .....	55
3.8. Гистологические исследования .....	55
3.9. Иммуногистофлуоресцентное окрашивание (ИГФ) .....	57
3.10. Забор образцов для электрофореза и вестерн-блоттинга.....	59
3.11. Подготовка проб к проведению электрофореза.....	60
3.12. Вестерн-блоттинг .....	60
3.13. Проточная цитофлуориметрия и сортирование клеток. ....	61
3.14. ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) .....	62
3.15. Статистический анализ.....	65
<b>4. РЕЗУЛЬТАТЫ .....</b>	<b>66</b>
4.1. Разработка новой экспериментальной модели почечного повреждения .....	66
4.1.1. Подбор экспериментального дизайна модели фототромбоза .....	66
4.1.2 Макроскопические изменения в зоне поврежденного очага. ....	68
4.1.3. Гистологические изменения в области очага фототромбоза.....	72
4.1.4. Фототромбоз приводил к повышению уровня маркеров повреждения и пролиферации. ....	76
4.1.5. Фототромбоз вызвал почечную дисфункцию .....	79
4.1.6. Фототромбоз вызвал фиброз почек .....	82
4.2. Исследование влияния синаптамида на развитие почечного	

повреждения вследствие ишемии/реперфузии .....	85
4.2.1. Синаптамид снижал воспаление в почечной ткани после ишемического повреждения .....	85
4.2.2. Эффекты синаптамида на инфильтрацию лейкоцитов в ткань почки после ишемии .....	87
4.2.3. Синаптамид оказывает свое противовоспалительное действие через рецептор GPR110 нейтрофилов .....	91
4.2.4. Эффекты синаптамида на тяжесть ОПП .....	93
4.3. Развитие ОПП у новорожденных при системном воспалении .....	95
4.3.1. Повреждение почек у новорожденных крысят при действии ЛПС в разных дозах .....	95
4.3.2. Оценка почечной функции при ОПП, вызванном системным воспалением, и терапии антибиотиками при экспериментальном моделировании .....	103
4.3.3. Оценка развития ОПП и влияния терапии антибиотиками у новорожденных пациентов с признаками сепсиса .....	111
<b>5. ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>115</b>
<b>6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>135</b>
<b>7. ВЫВОДЫ .....</b>	<b>138</b>
<b>8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>139</b>

## **Список сокращений**

АС - аденилатцикла

АТФ - Аденозинтрифосфат

ВН4 - тетрагидробиоптерин

BUN - blood urea nitrogen - мочеви́на

CD - кластер дифференцировки

COX - циклооксигеназа

DAMP - молекулярные паттерны, связанные с повреждением

DC - дендритные клетки

ELISA - Иммуноферментный анализ

ER - эндоплазматический ретикулум

L-FABP - связывающий жирные кислоты печеночного типа

GFAP - Глиальный фибриллярный кислый белок

GSH - Глутатион

HIF - фактор, индуцированный гипоксией

HPRT - гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза

HRP - пероксидаза хрена

ICAM - молекула клеточной адгезии

IFN - интерферон

IL - интерлейкин

KIM - молекула повреждения почек

LOX - липоксигеназа

LPS - липополисахарид

MAPK - митоген-активируемая протеинкиназа

MCP - моноцитарный хемотаксический белок

MHC - главный комплекс гистосовместимости

MMPs - матриксные металлопротеиназы

MSB - Martius yellow-brilliant crystal scarlet-methyl blue

NGAL - липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов

NK - естественные киллеры

NKT - естественные Т клетки-киллеры

NO - оксид азота

NOS - синтаза оксида азота

PAMP - молекулярные паттерны, связанные с повреждением с патогенами

PAS - реакция с периодной кислотой

PBMC - мононуклеарные клетки периферической крови

PBS - фосфатно-солевой буфер

PCNA - ядерный антиген пролиферирующих клеток

PKA - протеинкиназа А

PMSF - фенилметансульфонил фторид

PRR - паттерн-распознающие рецепторы

PT - фототромбоз

PVDF - поливинилиденфторид

SCr - сывороточный креатинин

SEM - стандартная ошибка среднего

TGF - Трансформирующий фактор роста

TLR - Toll-like рецептор

TNF - фактор некроза опухоли

ТТС - трифенилтетразолий хлорид

АФК - активные формы кислорода

БР - Бенгальский розовый

ЗПТ - заместительная почечная терапия

ИГФ - иммуногистофлуоресценция

КТ - компьютерная томография

ММР - матриксные металлопротеиназы

НПВП -нестероидные противовоспалительные препараты

ОПП - острое почечное повреждение

СКФ - скорость клубочковой фильтрации

ХБП - хроническая болезнь почек

## 1. ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность и степень разработанности темы

Острое почечное повреждение (ОПП) является патологическим состоянием с быстрым и резким снижением почечной функции и ассоциировано с повышенным риском развития хронической болезни почек (ХБП) [Makris, Spanou, 2016; Negi и др., 2018]. ОПП является частым осложнением и выявляется в 15% случаев госпитализаций в целом, а также более чем у 50% больных в палатах интенсивной терапии [Khan, Khan, 2015]. В настоящее время не существует специальной фармакологической терапии для пациентов с ОПП, а стратегия лечения ограничивается поддерживающей и заместительной почечной терапией, которая ассоциирована с повышением уровня смертности до 50% [Mercado, Smith, Guard, 2019]. Кроме того, ОПП является частым осложнением у новорожденных пациентов с системным воспалением, лечение которого сопряжено с использованием терапии антибиотиками, в свою очередь обладающими нефротоксичностью [Coggins и др., 2021; Mohamed и др., 2022]. В связи с высокой распространенностью и отсутствием специфической терапии ОПП, требуется более детальное изучение молекулярных механизмов повреждения и регенерации почек, что позволит разработать целенаправленные методы лечения ОПП и ХБП.

В настоящее время для изучения механизмов ОПП используют различные экспериментальные подходы, например, модель ишемии/реперфузии (И/Р) почки и модели повреждения, индуцированного эндотоксином или нефротоксичными веществами [Wao и др., 2018; Shiva и др., 2020]. Основной особенностью этих широко используемых подходов является развитие генерализованного поражения органа. В настоящее время существует очень мало моделей ОПП, направленных на образование локального очага повреждения, при котором можно четко визуализировать границу между поврежденной и здоровой тканью. Такой подход позволяет наблюдать процессы в зоне, в которой произошло сублетальное повреждение

с возможностью восстановления, что открывает новые возможности изучения изменений непосредственно в очаге инфаркта и прилегающих участках. Это объясняет необходимость разработки новых моделей повреждения почки, приводящих к развитию локального повреждения органа. Такие подходы хорошо описаны для мозга, например, при моделировании инсульта широко применяются фототромбоз с использованием фотосенсибилизатора Бенгальского розового [Watson и др., 1985]. Модель фототромбоза проста в реализации, обладает высокой воспроизводимостью и малой инвазивностью, что объясняет ее активное использование для изучения патологий головного мозга [Uzdensky, 2018]. Однако, несмотря на распространенность при моделировании инсульта, эта модель еще не адаптирована для других органов. Учитывая широту применения фототромбоза при инфаркте головного мозга, а также простоту реализации данной модели, мы предполагаем, что этот метод может быть использован для моделирования ишемических патологий различных органов, в том числе почек. Мы предполагаем, что ишемия почек, вызванная фототромбозом, может стать полезной моделью для лучшего понимания молекулярных механизмов повреждения почек как при ОПП, так и при ХБП, а также регенерации поврежденного органа.

В связи с тем, что заболевания, ассоциированные с ишемическим повреждением ткани или системным воспалением, являются одними из ведущих причин инвалидизации и смертности, активно ведутся научные исследования, посвященные развитию данных состояний. Несмотря на большое внимание к данной проблеме до сих пор имеются пробелы в понимании фундаментальных механизмов развития подобных повреждений, что осложняет поиск их терапии. Одним из механизмов, лежащих как в основе запуска повреждения, так и адаптации ткани к ишемии, является процесс воспаления. Хотя в целом оно является нормальным ответом ткани и участвует в ее восстановлении, во многих случаях данная реакция организма проявляется чрезмерно и может приводить к еще большему повреждению

тканей [Rabb и др., 2016]. Поэтому важно выявить, в какой момент и при каких условиях данная реакция переходит из адаптивной в патологическую. В ответ на ишемию и гипоксию повышается экспрессия молекул адгезии клетками сосудистой стенки и происходит активация лейкоцитов [Bonventre, Yang, 2011]. Данные события повышают секрецию провоспалительных и профибротических молекул, приводят к активации свертывания крови и ухудшению кровотока в капиллярах. Повышается адгезия и инфильтрация иммунных клеток, таких как нейтрофилы и макрофаги, секретирующие фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и провоспалительные интерлейкины, повышение экспрессии которых связано со значительным тканевым повреждением при ОПП [Bonventre, Zuk, 2004]. Кроме того, активация эндотелия и привлечение циркулирующих иммунных клеток происходит при высвобождении некротизированными клетками молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением [Anders, Schaefer, 2014]. Одними из ключевых участников этих процессов являются нейтрофилы, которые могут приводить к дальнейшему повреждению эпителиальных клеток почечных канальцев [Kinsey, Li, Okusa, 2008]. Продукция цитокинов, протеаз, металлопротеаз, активных форм кислорода данными иммунными клетками приводит к повышенной сосудистой проницаемости, а также нарушению целостности эпителиальных и эндотелиальных клеток канальцев, что усугубляет повреждение почек [Parkos, 2016]. В связи с тем, что воспаление играет важную роль в большинстве патологий, новые подходы к терапии ОПП могут быть основаны на регуляции воспалительной реакции. Помимо традиционных противовоспалительных препаратов, одним из многообещающих соединений является производное омега-3 жирной кислоты, схожее по структуре с анандамидом - этаноламид докозагексаеновой кислоты, синаптамид. Данное вещество ранее изучалось в контексте повреждения мозга и обладало выраженными нейропротекторными и синаптогенными эффектами, а также снижало нейровоспаление [Kim и др.,

2011; Kim, Spector, 2013; Ponomarenko и др., 2021; Starinets, Tyrtysnaia, Manzhulo, 2023].

Таким образом, изучение молекулярных и клеточных механизмов повреждения почки после ишемии или системного воспаления является актуальной исследовательской задачей. Разработка новой экспериментальной модели ОПП поможет более детально изучить морфофункциональные особенности повреждения и восстановления органа и в дальнейшем может быть использована для тестирования терапевтических веществ. Изучение таких последствий повреждения, например, воспаления может помочь в выявлении потенциальных мишеней для модуляции этих негативных последствий, а поиск нефропротекторных веществ не только приближает разработку эффективной патогенетической терапии, но и может быть полезен для выявления ключевых патогенетических звеньев ОПП.

### **Цели и задачи исследования**

**Целью данной работы** являлось изучение механизмов острого почечного повреждения в моделях ишемии и системного воспаления, а также поиск потенциальных подходов для терапии ОПП.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи данной работы**:

- 1) Разработка новой экспериментальной модели фокальной ишемии почки, основанной на фотоиндуцированном тромбозе сосудов, и подбор оптимального методического протокола
- 2) Всесторонняя характеристика модели фототромбоза почки с точки зрения гибели клеток почки, их регенерации, изменений в ткани почки и развития воспаления, а также оценки тяжести развивающегося ОПП
- 3) Оценка влияния терапии синаптамидом на фоне ОПП, вызванного ишемией/реперфузией почки, на воспалительный статус поврежденного

органа, изменение степени инфильтрации и популяционного состава иммунных клеток в почке

4) Выявление механизмов противовоспалительного действия синаптамида на фоне И/Р и исследование роли нейтрофилов в патогенезе ОПП

5) Оценка развития почечного повреждения у новорожденных при действии липополисахарида (ЛПС), при последовательном введении ЛПС и гентамицина, а также исследование влияния применения антибиотиков у новорожденных пациентов с подозрением на сепсис с точки зрения тяжести ОПП.

### **Научная новизна работы**

В рамках данной работы впервые разработана новая экспериментальная модель повреждения почки, основанная на фотоиндуцированном тромбозе сосудов, вызванном световой активацией молекул фотосенсибилизатора Бенгальского розового. Данная модель широко применялась для моделирования инсульта, однако слабо транслировалась на другие органы. Разработан методический протокол, который можно будет адаптировать в зависимости от целей исследования. Кроме того, развивающееся повреждение охарактеризовано морфологически, гистологически и функционально, чего не было продемонстрировано ранее ни в одном исследовании.

Впервые оценено влияние синаптамида на И/Р-индуцированное острое почечное повреждение, а также выявлен предположительный механизм действия данного вещества. Впервые показано противовоспалительное действие синаптамида, которое реализуется через рецептор GPR110 нейтрофилов.

Впервые показано, что однократное введение антибиотика гентамицина может снижать тяжесть ОПП, вызванного системным воспалением у новорожденных животных. Проведен сбор и анализ клинических данных пациентов и предложены антибиотики, которые не усугубляют развитие ОПП у новорожденных пациентов с сепсисом.

## **Теоретическая и практическая значимость**

Фундаментальная научная проблема, на решение которой направлена работа - исследование механизмов повреждения одного из жизненно важных органов, почки, с целью поиска возможных подходов к увеличению устойчивости данного органа к повреждению. Понимание факторов, влияющих на развитие повреждения и ишемическую толерантность конкретного органа, является основой стратегией поиска терапии не только ОПП, но и других патологических состояний, ассоциированных с ишемией, таких как инсульт и инфаркты органов, а также патологий, при которых возможно недостаточное снабжение тканей кислородом и питательными веществами.

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, представляются значимыми с точки зрения, как фундаментальной науки, так и клинической медицины, так как в ней раскрываются молекулярные механизмы, объясняющие причины развития почечного повреждения, а также тестируются возможные терапевтические агенты. Помимо этого, с точки зрения экспериментальных исследований значимость заключается в разработке новой экспериментальной модели очаговой ишемии почки, которая в дальнейшем может быть использована другими исследователями. Но не менее важна и клиническая значимость, так как полученные данные могут лечь в основу разработки перспективных методов терапии ОПП. Кроме того, показаны антибиотики, которые не усугубляли тяжесть ОПП у пациентов с сепсисом, что может быть полезно в клинической практике и корректировке курса антибактериальной терапии.

## **Методология и методы исследования**

В работе проводилось моделирование эндотоксинемического ОПП на новорожденных крысах или И/Р-индуцированного ОПП на взрослых крысах. Кроме того, в рамках диссертации была разработана новая экспериментальная

модель, вызванная фотоиндуцированным тромбозом сосудов, которая до этого никогда не использовалась для моделирования повреждения почки. Для оценки функции и повреждения почек после моделирования ОПП у животных оценивали такие маркеры, как креатинин и мочевины в сыворотке крови, а также липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов (NGAL) и молекула повреждения почек 1 (KIM-1) в моче.

В случае новой экспериментальной модели фототромбоза почки оценивали объем повреждения путем окрашивания прижизненных срезов почки хлоридом 2,3,5-трифенилтетразолия (ТТС) или с помощью метода микрокомпьютерной томографии. Проницаемость сосудов оценивали по экстравазации красителя Эванса синего из кровотока в ткань почки. Через 24, 48 часов или через 1 месяц почки с локальным очагом повреждения фиксировались в формалине для изготовления срезов и гистологических окрашиваний, таких как гематоксилин-эозин, реакция с Шифф-йодной кислотой (ШИК-реакция), окраски для оценки состояния внеклеточного матрикса и развития фиброза. Кроме того, проводили иммуногистофлуоресцентные окрашивания антителами против  $\beta$ -актина, KIM-1, ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA).

У экспериментальных животных после моделирования различных типов повреждения получали образцы гомогенатов почечной ткани, в которых с помощью метода вестерн-блоттинга исследовали воспаление, интенсивность окислительного стресса, активацию апоптоза или активность процессов регенерации.

Для исследования влияния синаптамида на воспаление, развивающееся при И/Р почки, получали суспензии клеток почки для анализа методами проточной цитофлуориметрии и флуоресцентно-активируемого сортирования. Отобранные таким образом клетки использовали для дальнейшего исследования методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном

времени. Также получали образцы крови и почек для исследования различных маркеров, ассоциированных с воспалением, методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Фотоиндуцированный тромбоз сосудов с использованием фотосенсибилизатора Бенгальского розового подходит для моделирования ОПП и приводит к развитию выраженного очага повреждения, при котором наблюдается нарушение нормальной морфологии ткани почки, индукция апоптоза в зоне очага, активация пролиферативных процессов вокруг поврежденной зоны, а через месяц после фототромбоза в области инфаркта наблюдается развитие воспаления и фиброза.
2. При ишемии/реперфузии почки развивается воспаление в ткани, которое выражается в увеличении экспрессии провоспалительных цитокинов, а также в увеличении инфильтрации лейкоцитов, представленных нейтрофилами и макрофагами.
3. Терапия синаптамидом приводит к выраженному противовоспалительному эффекту на фоне И/Р-индуцированного ОПП, который реализуется через рецептор GPR110, расположенный на нейтрофилах, однако не снижает уровень маркеров ОПП при использованной дозе и длительности лечения.
4. Сепсис и системный воспалительный ответ вызывают развитие неонатального ОПП как в моделях на животных, так и у пациентов в клинике.
5. Применение гентамицина на фоне ЛПС-индуцированного ОПП у новорожденных крыс приводит к снижению тяжести повреждения почек, а ампициллин в комбинации с сульбактамом или метронидазол улучшают функцию почек у клинических пациентов с признаками сепсиса.

### **Степень достоверности данных**

Полученные в рамках выполнения работы данные статистически достоверны и воспроизводимы. Для решения поставленных задач выбран оптимальный набор современных экспериментальных методик. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальной литературы.

### **Публикации по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, из которых 8 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных.

### **Апробация работы и публикации**

Результаты диссертационной работы были представлены на международных конференциях XVII Международной (XXVI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции (Москва, 2022), XXVIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины - 2022» (Санкт-Петербург, 2022), 12-ой международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация" (Пушино, 2023), V Научно-практической конференции “Экспериментальная хирургия, анестезиология и реаниматология лабораторных животных” (Москва, 2023), Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии. Регенеративная биология и медицина» (2023, Москва, 15-16 ноября 2023), XIX Международной (XXVIII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, (Москва, март 2024), Всероссийской конференции с международным участием "Биохимия человека 2024" (17-19 октября 2024). По материалам работы опубликованы 8 тезисов докладов в сборниках российских и международных конференций.

Диссертационная работа апробирована 27 августа 2024 года на заседании отдела функциональной биохимии биополимеров НИИ ФХБ им.

Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова и 15 октября 2024 года на заседании кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

### **Личный вклад автора**

Соискатель лично принимал участие во всех этапах выполнения диссертационной работы, а именно планировал и проводил эксперименты, осуществлял моделирование патологий на животных методами экспериментальной хирургии, проводил биохимические, молекулярно-биологические и иммуногистофлуоресцентные исследования, подготовку клинических данных пациентов для биоинформатического анализа, статистическую обработку и обобщение результатов, написание статей и тезисов, представлял результаты работы на российских и международных конференциях.

### **Структура диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, методов и материалов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 156 страницах и иллюстрирована 36 рисунками. Список цитируемой литературы включает 216 наименования.

## **2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **2.1. Острое почечное повреждение**

#### **2.1.1 Понятие, критерии, эпидемиология и этиология ОПП**

Острое почечное повреждение (ОПП) является патологическим состоянием с быстрым и резким снижением почечной функции, которое может включать в себя как структурное повреждение, так и потерю фильтрующей способности органа [Makris, Spanou, 2016]. Острая почечная недостаточность характеризуется быстрым падением скорости клубочковой фильтрации (СКФ), происходящим в течение нескольких часов или недель, обычно проявляясь в накоплении продуктов азотного метаболизма в результате снижения почечной перфузии (преренальная азотемия), повреждения почечной паренхимы (острый канальцевый некроз, острый интерстициальный нефрит и гломерулонефрит) или обструкции мочевыводящих путей (постренальная азотемия), а также часто сопровождается олигурией [Khan, Khan, 2015]. ОПП ассоциируется не только с краткосрочными неблагоприятными последствиями, такими как перегрузка жидкостью и нарушение электролитного и кислотно-щелочного баланса, но и часто приводит к развитию ХБП или даже терминальной стадии почечной недостаточности [Negi и др., 2018].

ОПП представляет собой сложное клиническое состояние, которое характеризуется высокой заболеваемостью и летальностью. Среди госпитализированных пациентов его распространенность достигает до 15%, а у пациентов в критическом состоянии заболеваемость достигает до 60% [Khan, Khan, 2015; Makris, Spanou, 2016]. Уровень летальности составляет 60% в течение 1 года после эпизода ОПП, поэтому ОПП является важной проблемой для здравоохранения [Kellum и др., 2017]. Есть широкий спектр состояний, которые раньше относили к ОПП, от небольших изменений в биохимических маркерах функции почек до потери функции органа, требующей

заместительной почечной терапии, из-за чего данные о заболеваемости могут различаться [Rewa, Bagshaw, 2014].

В 2004 году были установлены критерии, определяющие такие понятия как риск, повреждение, почечная недостаточность, потеря функции почки и терминальная стадии почечной недостаточности (RIFLE) [Bellomo и др., 2004]. В 2007 году группа исследователей ОПП (AKIN) модифицировала критерии RIFLE, включив абсолютное изменение сывороточного креатинина (SCr). Позднее RIFLE и AKIN были объединены с критериями «Заболевания почек: улучшение глобальных результатов» (KDIGO) [Kellum, Lameire, KDIGO AKI Guideline Work Group, 2013]. На данный момент, согласно KDIGO, ОПП определяется одним или несколькими факторами, а именно

- Повышением SCr  $\geq 26.5$  мкм/л
- повышением SCr более чем в 1,5 раза по сравнению с исходным уровнем, произошедшее известно или предположительно в течение предшествующей недели
- снижение объема выделяемой мочи менее чем до 0,5 мл на 1 кг веса в час за 6 часов

Кроме того, согласно рекомендациях KDIGO ОПП классифицируется по степени тяжести в соответствии со следующими критериями:

Стадия	Сывороточный креатинин	Объем выделяемой мочи
1	в 1,5–1,9 раза выше исходного уровня или повышение на $\geq 0,3$ мг/дл ( $\geq 26,5$ мкмоль/л)	< 0,5 мл/кг/ч за 6–12 часов
2	в 2,0–2,9 раза выше исходного уровня	< 0,5 мл/кг/ч за 12 часов или более
3	в 3,0 раза выше исходного уровня, или повышение до $\geq 4,0$ мг/дл ( $\geq 353,6$ мкмоль/л), или начало заместительной почечной терапии или у больных младше 18 лет снижение расчетной скорости клубочковой фильтрации < 35 мл/мин на 1,73 м <sup>2</sup>	< 0,3 мл/кг/ч за 24 часа или более или анурия в течение 12 часов или более

**Рис. 1.** Стадирование острого повреждения почек по рекомендациям KDIGO [Khwaja, 2012].

Существует множество потенциальных причин ОПП, многие из которых связаны с несоответствием между доставкой кислорода и питательных веществ к нефронам и потребностью нефронов в энергии. Концептуально этиология ОПП делится на три категории: преренальная, интратренальная и постренальная, хотя чаще всего ОПП является многофакторным состоянием, а патогенетические механизмы, вовлеченные в развитие разных категорий могут быть вовлечены в прогрессирование ОПП [Turgut, Awad, Abdel-Rahman, 2023]. При преренальной азотемии наблюдается снижение СКФ на фоне изменений SCr, но повреждения канальцев не наблюдается. Внутренние причины почечной недостаточности могут быть связаны с ишемией, токсинами или первичным интерстициальным или клубочковым заболеванием. Важно понимать, что относительное кислородное голодание часто не носит общего характера, но из-за сложности взаимоотношений сосудов и канальцев в почках функциональные последствия локализованного повреждения канальцев могут усиливаться. Другие причины связаны с прямым токсическим воздействием веществ на сосудистую сеть или эпителий. Почки особенно чувствительны к токсическому воздействию многих веществ окружающей среды или терапевтических средств, поскольку многие из этих соединений концентрируются в канальцах по мере продвижения фильтрата вниз по нефрону [Bonventre, 2008].

### **2.1.2 Диагностические маркеры ОПП.**

Несмотря на то, что уровень креатинина в сыворотке является общепризнанным критерием ОПП, данный маркер является несовершенным. СКФ широко признана лучшим общим показателем функции почек в здоровом состоянии и при заболеваниях, однако, в связи с трудностью измерения обычно она косвенно оценивается по уровню эндогенных маркеров фильтрации в сыворотке, таких как креатинин [Lopez-Giacoman, Madero, 2015].

К моменту достижения повышения SCr, соответствующего критериям для детектирования ОПП, снижение СКФ и вероятное структурное повреждение, предшествовавшее этому снижению, развивались в течение нескольких часов или дней. Была выдвинута гипотеза, что задержка обнаружения ОПП является одной из причин, по которой до сих пор не удается найти эффективное лечение ОПП. Поэтому активно ведется поиск новых биомаркеров, которые позволили бы обнаружить повреждение почек до изменения в функциональных биомаркерах, таких как SCr и сывороточный цистатин С, и которые были бы связаны с клиническим течением ОПП и могли бы предсказывать необходимость диализа или другие осложнения. Некоторые из этих биомаркеров предоставляют информацию о повреждении канальцев, которое обычно предшествует функциональным нарушениям в почке. Часть из этих маркеров довольно широко изучена и даже одобрена для выявления ОПП некоторых странах. Примерами новых биомаркеров являются uNGAL, который используют как дополнение к диагностике в Европе, печеночная форма белка, связывающего жирные кислоты (L-FABP), одобренный в Японии, а комбинация тканевого ингибитора металлопротеиназы-2 и белка 7, связывающего инсулиноподобный фактор роста, может быть использована в США [Hertzberg и др., 2017].

### **2.1.3 Основные звенья патогенеза ОПП**

Патогенез ОПП сложен и в некоторой степени варьируется в зависимости от конкретной причины развития ОПП, однако в нем можно выделить много сходящихся процессов, приводящих к повреждению тканей или дисфункции органа. Ишемически-реперфузионное повреждение можно рассматривать как одну из частых причин развития ОПП. Данное состояние может быть вызвано трансплантацией органа, травматическим повреждением, сепсисом, недостаточной перфузией органа из-за кровопотери или операции, обезвоживанием или шоком, которое в результате приводит к снижению кровотока в почке. Патофизиология всех данных повреждений включает

воспаление, нарушение баланса между окислителями и антиоксидантами, снижение почечного кровотока, апоптотическую и некротическую гибель клеток почки [Bonventre, 2010; Paskialakshmi и др., 2020]. Одной из частных причин ОПП также является токсическое повреждение. Помимо прямого нефротоксического действия, действие повреждающих веществ в конечном итоге приводит к развитию локальных ишемических процессов.

При недостаточной перфузии эпителиальные клетки не в состоянии поддерживать достаточное количество внутриклеточного АТФ для необходимых процессов. При недостатке АТФ происходит повреждение клеток, которое может привести к их гибели. Во время ишемического инсульта могут быть поражены все сегменты нефрона, но наиболее уязвимыми является эпителий проксимальных канальцев. Эти клетки особенно чувствительны по ряду причин. Во-первых, они обладают высокой скоростью метаболизма, необходимой для обеспечения транспорта ионов, и ограниченной способностью к анаэробному гликолизу. Во-вторых, из-за особенностей кровотока сегмента S3 нефрона после повреждения в этой области наблюдается выраженная гипоперфузия микрососудов и застойные явления, которые сохраняются и способствуют продолжению ишемии, даже когда кровоток в корковом веществе, возможно, вернулся к почти нормальному уровню. В такое продление ОПП в первую очередь вносят вклад повреждение и дисфункция эндотелиальных клеток [Molitoris, Sutton, 2004]. Стоит отметить, что ишемическое повреждение может локализоваться в определенных микрососудистых областях, а не во всей почке, в связи с чем оценка общего почечного кровотока как показателя эффективности кровотока может ввести в заблуждение.

Другими основными эпителиальными клетками нефрона, участвующими в патофизиологии ишемического ОПП, являются клетки толстого восходящего колена петли Генле в мозговом слое. Также при ОПП у человека были обнаружены апоптотические изменения в дистальных

сегментах нефрона. Патогенетические процессы, происходящие при ишемическом или септическом повреждении, приводят к вазоконстрикции афферентных артериол. Сужение данных сосудов развивается вследствие канальцево-клубочковой обратной связи, обструкции просвета и обратного оттока фильтрата через поврежденные клетки проксимальных канальцев, что приводит к неэффективной клубочковой фильтрации и сильному снижению СКФ [Alejandro и др., 1995; Ramaswamy и др., 2002].

Почки очень чувствительны к гипоксии из-за своей микрососудистой структуры [Evans и др., 2008]. Помимо использования для митохондриального дыхания, кислород также необходим для генерации активных форм кислорода (АФК) и оксида азота (NO). Генерируемый эндотелиальной синтазой оксида азота (eNOS) NO обладает вазодилататорным действием, а также ингибирует агрегацию тромбоцитов и предотвращает активацию и инфильтрацию лейкоцитов посредством эндогенных противовоспалительных свойств. Истощение таких кофакторов eNOS, как L-аргинин и тетрагидробиоптерин (BH<sub>4</sub>), например, при реперфузионном повреждении и сепсисе, может усилить выработку АФК путем разобщения eNOS [Rabelink, Zonneveld van, 2006]. При воспалении может активироваться индуцибельная NOS, что приводит к избытку NO, который может ингибировать митохондриальное дыхание за счет конкуренции с кислородом за митохондриальную цитохромоксидазу [Cooper, Giulivi, 2007]. Для нормальной функции почек очень важен баланс между кислородом, АФК и NO. При ишемии и воспалении нарушается поддержание этого баланса, что приводит к развитию окислительного стресса и повреждению тканей. При окислительном стрессе нарушается соотношение окислителей и антиоксидантов в клетке, что приводит к повреждению клеточных молекулярных структур [Clanton, 2007]. АФК включают супероксид-радикал, гидроксил-радикал, а также ряд нерадикальных соединений, таких как перекись водорода, озон и хлорноватистая кислота. Стоит отметить, что генерация АФК происходит и в нормальных условиях АФК и играет регуляторную роль. АФК метаболизируются эндогенными

антиоксидантами, такими как глутатион, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и каталаза, аскорбат и витамин E [Bayir, 2005]. Как высокие, так и низкие уровни парциального давления кислорода способствуют окислительному стрессу, поэтому важно поддержанием парциального давления кислорода в физиологических пределах [Aksu, Demirci, Ince, 2011]. В связи с тем, что почка обладает огромной потребностью в энергии, очень богата митохондриями, которые являются основным источником АФК, данный орган сильно подвержен повреждению и развитию окислительного стресса [Friederich-Persson и др., 2018; O'Connor, 2006; Wang и др., 2010]. В почках эпителиальные клетки канальцев сильно восприимчивы к окислительному стрессу, особенно во время фазы реперфузии после ишемии [Kurts и др., 2013].

В основе патогенеза ОПП лежит сложное взаимодействие между сосудистыми и канальцевыми процессами, которые в конечном итоге приводят к дисфункции органа. Патофизиологию ОПП можно разделить на микрососудистый и канальцевые компоненты. Эндотелий играет важную роль в регуляции сосудистого тонуса, функции лейкоцитов и чувствительности гладкой мускулатуры [Sprague, Khalil, 2009]. При ОПП разного генеза происходит повреждение эндотелия. При повреждении усиливается вазоконстрикцию артериол в пост-ишемической почке. Кроме того, происходит повышение уровней сосудосуживающих факторов, таких как эндотелина-1, ангиотензина II, тромбксана A<sub>2</sub>, простагландина H<sub>2</sub>. Почечной вазоконстрикции также способствует активация симпатических почечных нервов [Brooks, 1996; Conger, 1997; Kurata и др., 2005; Silveira da и др., 2010]. Сниженная чувствительность резистивных сосудов к вазодилаторам ацетилхолину, брадикинину и NO, а также сниженный уровень выработки некоторых вазодилаторов поврежденными эндотелиальными клетками могут усиливать действие этих сосудосуживающих агентов [Kwon, Hong, Ramesh, 2009]. При повреждении клеток эндотелия увеличивается проницаемость сосудов, что приводит к потере интерстициальной жидкости.

Повреждение эндотелия выражается в потере гликокаликса, нарушениях цитоскелета и межклеточных контактов [Basile, 2007; Rabelink, Boer de, Zonneveld van, 2010]. Кроме того, наблюдается усиление взаимодействия эндотелия и лейкоцитов. На эндотелиальных клетках при повреждении повышается экспрессия молекулы клеточной адгезии ICAM-1. Кроме того, наблюдается повышенной экспрессии соответствующих рецепторов на лейкоцитах и их активация [Kelly и др., 1996]. Вышеперечисленные процессы приводят к закупорке капилляров и посткапиллярных венул. Провоспалительный эффект усиливается дальнейшей активацией и привлечением лейкоцитов. Лейкоциты вырабатывают такие цитокины, как TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 и другие, усиливающие сосудистые эффекты при ишемических повреждениях [Bonventre, Zuk, 2004]. Кроме того, в дополнение к повышенному взаимодействию иммунных клеток и эндотелия происходит активация путей свертывания крови. Совокупность этих процессов приводит к закупорке мелких сосудов и локальной ишемии. В результате, нарушается доставка кислорода и питательных веществ к эпителиальным клеткам, что приводит к их повреждению этих клеток; кроме того, поврежденные клетки канальцев также вырабатывают провоспалительные медиаторы [Bonventre, 2008]. Из-за повреждения клеток проксимальных канальцев нарушаются процессы реабсорбции, в связи с чем плотное пятно детектирует поступление большего количества растворенных веществ в дистальный отдел нефрона, что приводит к активации канальцево-клубочковой обратной связи и функциональной вазоконстрикции приносящей артериолы клубочка [Blantz и др., 2007].

Клетки, подвергшиеся менее тяжелому повреждению, обладают способностью к функциональному и структурному восстановлению, если повреждение прерывается. Репарация включает в себя замену утраченных клеток в канальцах с помощью механизмов, которые до конца не изучены [Bonventre, 2002; Bonventre, 2008]. Клетки, подвергшиеся более тяжелому или

летальному повреждению, подвергаются апоптозу или некрозу, что приводит к гибели клетки.

Независимо от того, связано ли повреждение с кислородным голоданием, токсинами или, как это часто бывает, комбинацией нескольких факторов, можно выделить схожие процессы в реакции эпителиальных клеток. При ОПП нарушается целостность цитоскелета, который играет важную роль в поддержании структуры и функции клетки. При нарушениях цитоскелета в клетке могут нарушаться процессы движения органелл, экзо- и эндоцитоза, передачи сигналов, а также теряться полярность клетки [Molitoris, 2004]. При недостатке кислорода и питания происходит истощение пула АТФ в клетке. При недостатке АТФ происходит разрушение апикального F-актина путем деполимеризации, частично опосредованной кофилином [Ashworth и др., 2001; Ashworth и др., 2003; Atkinson, Hosford, Molitoris, 2004; Molitoris, Sutton, 2004]. Этот процесс вызывает нестабильность клеточной мембраны с образованием внеклеточных везикул, которые либо уходят в просвет канальца, либо интернализуются для потенциальной утилизации [Ashworth и др., 2007]. Кроме того, при ишемии дефосфорилируется эзрин, что приводит к разрушению связей между ядром F-актина и плазматической мембраной. При диссоциации тропомиозина нарушается стабилизация микрофиламента, что открывает доступ для кофилина [Ashworth и др., 2004; Chen, Doctor, Mandel, 1994]. При нарушении целостности актинового цитоскелета происходит потеря плотных контактов адгезионных контактов, что приводит к повышению парацеллюлярной проницаемости и обратному току гломерулярного фильтрата в интерстиций [Molitoris, Marrs, 1999]. Кроме того, при ишемии эпителиальные клетки часто теряют связь с внеклеточным матриксом. Данный процесс обеспечивается перемещением интегринов с базальной поверхности на апикальную, происходящим из-за истощения пула АТФ. Из-за потери интегринов происходит отсоединением клеток от базальной мембраны, что может приводит к образованию цилиндров из клеток в просвете канальцев [Zuk и др., 1998]. Одним из важных признаков

нормальной клетки эпителия проксимальных канальцев является расположение Na/K-АТФазы на базолатеральной поверхности клетки. Градиент ионов натрия, создаваемый Na/K-АТФазы, важен для реабсорбции веществ из просвета канальцев. При нарушениях цитоскелета происходит перемещение данного насоса на апикальную мембрану. Такие изменения приводят к двунаправленному переносу натрия через апикальную поверхность клетки и возвращению натрия в просвет канальца. Этот процесс является одним из основных механизмов высокой фракционной экскреции натрия, наблюдаемой у пациентов с острым канальцевым некрозом, и неэффективного использования клеточного АТФ, поскольку ишемические состояния нарушают использование АТФ и эффективный транцеллюлярный транспорт натрия [Molitoris, 1993; Molitoris, Geerdes, McIntosh, 1991]. Повышенное содержание ионов натрия в фильтрате, доходящем до дистальных канальцев, приводит к снижению СКФ из-за активации тубулогломерулярной обратной связи со стимуляцией плотного пятна, опосредующей афферентную артериолярную вазоконстрикцию.

Таким образом, отличительным признаком ишемического повреждения является нарушение структуры апикальной щеточной каемки клеток проксимальных канальцев, нарушение целостности цитоскелета и потеря полярности с неправильной локализацией молекул адгезии и других мембранных белков (например, Na/K-АТФазы и  $\beta$ -интегринов) [Zuk и др., 1998], происходят апоптоз и некроз [Nakhoul, Vatuman, 2011].

При тяжелом повреждении жизнеспособные и нежизнеспособные клетки слущиваются, оставляя области, где базальная мембрана остается единственным барьером между фильтратом и перитубулярным интерстицием. Эти клетки и их остатки соединяются с белком, присутствующим в просвете канальцев (например, белком Тамма-Хорсфалла и фибронектином), и попадают в просвет, образуя цилиндры, которые могут закупоривать канальцы, повышать внутриканальцевое давление и появляться в моче людей

как признак ОПП [Solez, Morel-Maroger, Sraer, 1979]. Это повышенное внутриканальцевое давление приводит к снижению градиента гидростатического давления в клубочках, что приводит к снижению СКФ и, в сочетании с потерей нормальной барьерной функции эпителия, обеспечивает обратный ток фильтрата. Активация и повреждение эпителия приводят к образованию воспалительных и вазоактивных медиаторов, которые могут оказывать аутокринное и паракринное действие на соседние эпителиальные клетки канальцев и могут воздействовать на сосудистую систему, усугубляя вазоконстрикцию и воспаление. Таким образом, воспаление вносит решающий вклад в патофизиологию ОПП [Bonventre, Zuk, 2004].

#### **2.1.4. Роль воспаления в патогенезе и разрешении ОПП.**

Воспаление — это сложная реакция, необходимая для уничтожения вредных патогенов и опосредования восстановления тканей после травмы. Однако избыточное и неразрешенное воспаление может способствовать аутоиммунным расстройствам, фиброзу и дальнейшему повреждению тканей [Medzhitov, 2010].

Иммунный ответ играет важную роль в развитии И/Р-индуцированного повреждения. Среди типов иммунного ответа можно выделить врожденный и адаптивный компоненты. При первичном ответе на повреждение вовлекаются различные типы иммунных клеток, например нейтрофилы и макрофаги [Saalmuller, 2010]. Так, количество нейтрофилов в интерстиции почки возрастает уже в течение 30 минут после ишемии, а количество макрофагов значительно увеличивается в первые сутки после повреждения [Bonavia, Singbartl, 2018]. Кроме того, важную роль играют дендритные клетки (DC), участвующие в презентации антигена, естественные киллеры (NK), привлекаемые за счет синтеза хемокинов эпителием почки, и естественные Т клетки-киллеры (NKT). Показано, что снижение количества привлекаемых NKT снижало повреждение, индуцированное ишемией, что говорит об их роли в патогенезе [Li и др., 2007]. В рамках адаптивного ответа, которые

развивается в течение суток после повреждения, происходит созревание DC, презентация антигена, пролиферация Т-лимфоцитов, их активация, а также взаимодействие Т- и В-лимфоцитов [Bonventre, Yang, 2011].

При повреждении клеток выделяются молекулы, которые считаются ключевыми триггерами воспаления после повреждения тканей [Chen, Nuñez, 2010]. Эпителий канальцев является активным участником воспалительного ответа при И/Р повреждении почек. Эпителий сам может генерировать ряд провоспалительных и хемотаксических цитокинов, таких как TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , а также костимулирующие молекулы, которые регулируют активность Т-лимфоцитов. Данные цитокины участвуют в активации иммунных клеток. Эпителиальные канальцевые клетки также экспрессируют Toll-подобные рецепторы (TLR), компоненты системы комплемента и рецепторы комплемента [Bonventre, Zuk, 2004].

Некротические клетки высвобождают молекулярные паттерны, связанные с повреждением (DAMPs), во внеклеточное пространство. Эти молекулы взаимодействуют с TLR- и NOD-подобными рецепторами, расположенными на эпителии, эндотелии, DC, моноцитах, макрофагах и лимфоцитах. Примерами DAMPs могут служить белок из высокомолекулярной группы 1, гистоны, белки теплового шока, фибронектин и бигликан [Anders, Schaefer, 2014; Kim и др., 2013; Kurts и др., 2013; Vallés и др., 2014]. TLRs представляют собой семейство эволюционно консервативных трансмембранных и паттерн-распознающих рецепторов (PRR), которые обнаруживают экзогенные микробные продукты или эндогенные лиганды хозяина, высвобождаемые во время повреждения [Aderem, Ulevitch, 2000; Johnson, Brunn, Platt, 2003]. Во время ОПП эпителиальные клетки почечных канальцев экспрессируют повышенное количество как TLR2, так и TLR4, которые модулируют степень повреждения [Jang и др., 2009]. При активации TLRs происходит высвобождение цитокинов и хемокинов, которые привлекают иммунные клетки. Активированные клетки почечной паренхимы

и DC секретируют хемокины, включая CXCL1, CXCL8 и CCL2, которые способствуют опосредованным нейтрофилами и макрофагами воспалительным реакциям при ОПП [Bolisetty, Agarwal, 2009; Kurts и др., 2013]. Зависящие от времени изменения экспрессии провоспалительных, например, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-17, C3, C5a и C5b, и противовоспалительных, например, IL-4, TGF- $\beta$ , IL-10, гем-оксигеназа 1, резольвины и протектин D1, медиаторов резидентными и рекрутированными популяциями клеток являются важными детерминантами фаз повреждения и восстановления [Kurts и др., 2013]. В идеальных условиях тонкий баланс между воспалительными и противовоспалительными факторами обеспечивает надежное восстановление тканей и возвращение гомеостатических условий. Однако ОПП часто приводит к аномальному процессу восстановления в результате длительной гипоксии и постоянной секреции профибротических молекул, например, IL-13 и TGF- $\beta$ 1. Повышенный синтез данных цитокинов может приводить замещению функциональной ткани соединительной, а именно развитию фиброза. Уменьшение количества нормально функционирующих тканей усугубляет повреждение почки и приводит к развитию ХБП [Anders, Schaefer, 2014; Kurts и др., 2013].

Эпителий проксимальных канальцев может представлять антиген Т-клеткам за счет экспрессии МНС II [Wahl и др., 2002]. CD40 экспрессируется в клеточной мембране эпителиальной клетки, за счет чего эпителий может реагировать на лиганды Т-клеток. CD4<sup>+</sup> Т-клетки, экспрессирующие CD154, взаимодействуют с CD40 и приводят к его трансплантации в цитоплазму. CD40-CD154 взаимодействие приводило к активации MAPK, продукции MCP-1 и IL-8 в клетках проксимальных канальцев. Связывание CD40 также участвовало в привлечении ассоциированного с рецептором TNF фактора 6 (TRAF6), о чем свидетельствует их колокализация в клетках проксимальных канальцев [Li, Nord, 2002]. Связывание CD40 также увеличивало генерацию RANTES эпителием почечных канальцев человека, что может быть усилено продукцией IL-4 и IL-13 клетками Th2 [Deckers и др., 1998]. И/Р увеличивает

экспрессию костимулирующих молекул канальцевых клеток В7-1 и В7-2, которые взаимодействуют с CD28 на Т-лимфоцитах и способствуют выработке цитокинов, что было продемонстрировано как на животных, так и на клетках [Niemann-Masaneck и др., 2002].

Нейтрофилы являются важнейшими компонентами врожденного иммунитета и обеспечивают быстрый ответ на вторгающиеся патогены или повреждение тканей. Нейтрофилы обезвреживают патогены путем фагоцитоза или высвобождения гранул, содержащих протеазы, другие ферменты или АФК. В связи с этим, дегрануляция нейтрофилов сама может приводить к повреждению клеток в зоне воспалительного ответа. Так, было показано, что после И/Р или повреждения цисплатином происходит быстрое и резкое увеличение числа нейтрофилов в ткани почки, а отсутствие нейтрофилов или прекращение их инфильтрации в почку снижало ОПП [Kelly и др., 1996; Li и др., 2007; Li и др., 2010; Tadagavadi, Reeves, 2010]. В дополнение к высвобождению гранул нейтрофилы продуцируют провоспалительные цитокины IFN- $\gamma$  и IL-17, а также хемокин CXCL1, в поврежденной почке [Kinsey, Okusa, 2012].

Одними из ключевых клеток также являются макрофаги, количество которых сильно возрастает в течение часа после И/Р [Li, Okusa, 2010]. Макрофаги распознают начальные сигналы о повреждении с помощью рецепторов PRR, распознающих DAMPs и PAMPs. Распознавание DAMP/PAMP через PRR приводит к стимуляции фагоцитоза макрофагов, созреванию фаголизосом, презентации антигена и продукции провоспалительного цитокина TNF $\alpha$  [Zhang и др., 2012]. После первоначальной реакции на травму резидентные макрофаги дополнительно продлевают воспаление, привлекая другие лейкоциты к месту повреждения. макрофаги также выделяют хемокины и цитокины для привлечения других иммунных клеток. Например, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и гистамины действуют на эндотелиальные клетки, увеличивая экспрессию транспортных молекул

(селектинов и лигандов интегрина), тогда как хемокины CXCL1, CXCL2 и CCL2 напрямую рекрутируют нейтрофилы для выхода из кровеносной системы в интерстиций [Nourshargh, Alon, 2014]. За первоначальным воспалительным ответом с участием макрофагов следует модуляция, а затем ингибирование воспалительной реакции.

Детальное понимание клеточных и молекулярных механизмов, определяющих течение внутривисцерального воспаления, считается одним из наиболее многообещающих путей к разработке новых методов лечения для профилактики ОПП, уменьшения тяжести первоначального паренхиматозного повреждения или улучшения последующего восстановления и регенерации почки.

Среди наиболее ярких достижений в исследованиях последнего десятилетия является признание того, что многие из тех же самых триггеров и клеточных медиаторов, которые ответственны за первоначальное повреждение органов, также являются ключевыми игроками в последующей фазе восстановления и регенерации [Rabb и др., 2016]. Расширение понимания клеточных и молекулярных механизмов воспаления важно для поиска новых потенциальных терапевтических мишеней, которые позволят снизить повреждение органов на ранних стадиях ОПП.

### **2.1.5. Развитие ОПП при системном воспалении.**

Сепсис представляет собой тяжелое системное состояние, вызванное инфекцией и характеризующееся выраженной воспалительной реакцией организма. Основные патофизиологические механизмы сепсиса, приводящие к полиорганной недостаточности, основаны на активации как системных, так и местных иммунных и воспалительных реакций, в результате чего нарушается целостность органов и тканей.

Основной механизм распознавания патогенов в сепсисе осуществляется через патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs), которые активируют специфические рецепторы, такие как TLR. Липополисахарид (ЛПС), присутствующий в клеточной стенке грамотрицательных бактерий, является одним из самых мощных стимуляторов воспаления и активатором TLR4 [Akira, Uematsu, Takeuchi, 2006]. Активация TLR4 на клетках иммунной системы приводит к запуску каскада воспалительных реакций, включая выделение провоспалительных цитокинов, таких как TNF- $\alpha$ , IL-1 и IL-6, что способствует дальнейшему развитию сепсиса и его осложнений, таких как острое повреждение почек (ОПП) [El-Achkar, Hosein, Dagher, 2008].

Развитие полиорганной недостаточности при сепсисе связано с дисбалансом между про- и противовоспалительными процессами в организме. Воспалительные медиаторы, такие как TNF- $\alpha$  и IL-1, играют ключевую роль в повреждении тканей, вызывая системное воспаление, активацию коагуляции и нарушение микроциркуляции [Jean-Baptiste, 2007]. В почках воспаление приводит к ишемии вследствие нарушения микроциркуляции и активации лейкоцитов, что вызывает повреждение канальцев и развитие острого почечного повреждения [Chvojka и др., 2010].

Помимо системных эффектов, сепсис также вызывает прямое повреждение почек через взаимодействие ЛПС с TLR4, локализованным на клетках почечных канальцев. Это взаимодействие инициирует локальный воспалительный процесс и окислительный стресс, которые усугубляют

повреждение почек [El-Achkar, Hosen, Dagher, 2008]. Феномен ишемии-реперфузии, который наблюдается при восстановлении кровотока в поврежденных тканях, также играет важную роль в патогенезе почечной недостаточности. Реперфузия приводит к образованию активных форм кислорода (АФК), что усугубляет повреждения клеток и повышает риск полиорганной недостаточности [Gomez и др., 2014].

Изменения в микроциркуляторном русле почек при сепсисе включают повышение неоднородности кровотока, что увеличивает время контакта активированных лейкоцитов с тканями, способствуя усилению воспаления и повреждению эпителиальных клеток. АФК играют важную роль в повреждении почечных канальцев, особенно в сегментах S2 и S3 проксимальных канальцев, что приводит к их дисфункции [Kalakeche и др., 2011].

Макрофаги являются основными клетками, участвующими в воспалительном процессе в почках при сепсисе. В начальных стадиях сепсиса они дифференцируются в фенотип M1, способствующий выделению провоспалительных цитокинов и развитию воспаления. На более поздних стадиях макрофаги M2 участвуют в регенерации тканей и восстановлении функции почек [Jo и др., 2006]. Продукция активных форм кислорода и азота макрофагами M1 усиливает повреждение тканей, в то время как M2 фенотип способствует ангиогенезу и восстановлению клеток.

Сепсис вызывает системную артериальную вазодилатацию, что приводит к снижению почечной перфузии и развитию почечной недостаточности. Активация симпатической нервной системы и ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) способствует поддержанию системного артериального давления, но при этом усугубляет почечную недостаточность за счет вазоконстрикции почечных артерий [Schrier, Wang, 2004]. Эндотелий сосудов почек также подвергается повреждению вследствие

дисбаланса оксида азота и активации провоспалительных факторов, что приводит к микроциркуляторным нарушениям [Gomez и др., 2014].

Таким образом, сепсис представляет собой сложное состояние, включающее множество патофизиологических механизмов, приводящих к развитию полиорганной недостаточности, включая острое повреждение почек. Воспалительные процессы, вызванные активацией PAMPs и TLR, в сочетании с нарушениями микроциркуляции и окислительным стрессом, играют центральную роль в патогенезе сепсиса и его осложнений.

## **2.2. Экспериментальное моделирование ОПП**

### **2.2.1. Признанные модели ОПП.**

Существует несколько признанных моделей ОПП, наиболее широко используемой из которых является И/Р почки [Shiva и др., 2020]. Она реализуется путем наложения зажима на сосудистую ножку, что приводит к прекращению поступления крови в орган, и как следствие кислорода и питательных веществ в орган с последующим восстановлением кровотока [Ramesh, Ranganathan, 2014]. Другой тип модели ОПП основан на действии нефротоксичных веществ, снижающих функцию почек. Главной особенностью этих широко используемых моделей является повреждение всей почки. На данный момент описано очень мало моделей ОПП, которые затрагивают только отдельные области почки, например, модель тромбоза и клипирования или лигирования отдельных почечных артериол [Bordoni и др., 2023], при этом такие модели могут помочь различить процессы, происходящие в поврежденном участке почки и прилегающих к нему зоне.

Модель И/Р почек заключается во временном нарушении и последующем восстановлении доставки кислорода и питательных веществ в почку. При ишемии происходит каскад клеточных реакций, приводящих к повреждению канальцев и их гибели. Кроме того, вследствие И/Р развивается выраженное воспаление и нарушения в сосудах. Модель И/р также может

использоваться для изучения долгосрочных последствий ОПП, например, у грызунов в течение нескольких недель или месяцев могут развиваться хронические почечные патологии и ХБП [Fu и др., 2018]. И/Р повреждение вызывается хирургическим пережатием сосудистого пучка почки. Этот подход позволяет вызвать контролируемое ОПП. Есть несколько факторов, влияющих на тяжесть И/Р-индуцированного ОПП, например, время пережатия почечной ножки и давление зажима, поддержание постоянной температуры тела во время моделирования повреждения, например, регуляторы температуры с ректальным датчиком, водяные бани или хирургические платформы с электрическим подогревом, изменения температуры в операционной, состояние гидратации животного и хирургические навыки экспериментатора. Хирургические навыки очень важны, так как постановка модели И/Р проводятся манипуляции с сосудами, а кратковременное пережатие сосудов почки может иметь защитный эффект - ишемическое прекондиционирование. Кроме того, важно грамотно подходить к выбору экспериментального дизайна, в том числе наркоза. Так, ингаляционный наркоз может снижать тяжесть развивающегося при И/Р ОПП [Hukriede и др., 2022].

Другая группа моделей основана на моделировании состояния сепсиса, который является частой причиной развития ОПП. Одним из способов моделирования сепсиса является введение липополисахарида, имитирующего повышенное воспалительное состояние. Данная модель является довольно простой в реализации, однако есть очень узкий диапазон между вызывающими ОПП и летальными дозами. Другой моделью сепсис-индуцированного ОПП является введение фекальной суспензии внутрибрюшинно [Brealey и др., 2004]. В данной случае активируются врожденные иммунные реакции через множественные рецепторы, в то время как при ЛПС-индуцированном ОПП действие реализуется через связывания с TLR4, который экспрессируется в основном в мононуклеарных фагоцитарных клетках (т. е. макрофагах и нейтрофилах) [Vaure, Liu, 2014].

Существуют модели, основанные на введении различных нефротоксических агентах, например, рентгеноконтрастные агенты, нестероидные противовоспалительные агенты и гентамицин. Эти модели хорошо применимы на крысах, но не на мышах, а также могут требовать нефизиологических дозировок и комбинаций воздействий [Hukriede и др., 2022].

### **2.2.2. Модель фототромбоза мозга как основа для создания новой модели повреждения почек**

Мы предполагаем, что фототромбоз-индуцированная ишемия почки может стать полезной моделью для лучшего понимания молекулярных механизмов повреждения и регенерации почек. Впервые фототромбоз с использованием Бенгальского розового был выполнен в 1985 году Уотсоном и соавторами в качестве модели инсульта [Watson и др., 1985]. В настоящее время этот подход широко применяется при экспериментальном моделировании очаговой ишемии, в основном головного и спинного мозга [Li и др., 2015b]. Модель фототромбоза проста в реализации, что определяет ее активное использование для экспериментальной моделирования патологий головного мозга. Однако, несмотря на ее распространенность в качестве модели повреждения мозга, данная модель до сих пор не адаптирована для других органов. Учитывая широту применения фототромбоза для моделирования повреждений мозга, мы предполагаем, что данная методика может быть полезна для моделирования ишемических патологий различных органов, в том числе почек.

Бенгальский розовый (4,5,6,7-tetrachloro-20,40,50,70-tetraiodofluorescein disodium) обладает циклической структурой с системой сопряженных двойных связей и может передавать энергию другим соединениям. БР относится к фотосенсибилизаторам II типа, это означает, что после активации он может передавать свою энергию непосредственно кислороду, что приводит к образованию синглетного кислорода, известного как АФК [Vanerio и др.,

2019]. Генерируемые вследствие световой активации Бенгальского розового АФК взаимодействуют с белками и липидами эндотелия и приводят к их повреждению. Активируются каскады свертывания, что приводит к локальному тромбообразованию.

Моделирование фототромбоза начинается с внутривенного введения фотосенсибилизатора. Раствор в течение определенного времени распределяется по кровотоку. Молекулы фотосенсибилизатора связываются с различными клетками кровяного русла, например, с эндотелием или тромбоцитами. Освещение определенной зоны интереса лазером вызывает активацию молекул фотосенсибилизатора, что приводит к образованию АФК. АФК вызывают повреждение мембран эндотелия сосудов, что приводит к агрегации тромбоцитов, образованию тромбов и окклюзии мелких сосудов. Таким образом, развивается локальная ишемия и гибель клеток в зоне тромбообразования [Cai и др., 2016; Uzdensky, 2018]. Таким образом, прерывается кровоснабжение и доступ кислорода к определенной зоне органа и имитируется состояние ишемии и характерных для нее черт. Например, из-за недостатка кислорода происходит снижение окислительного фосфорилирования и продукции АТФ, что приводит к активации гликолиза. [Uzdensky, 2018]. В процессе анаэробного гликолиза вырабатывается и накапливается молочная кислота, что приводит к ацидозу. Из-за недостатка АТФ невозможно поддержание нормальной работы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, которая играет важную роль в поддержании электрохимического градиента в почке, что приводит к нарушению транспорта ионов в почке [Hertz, 2008; Mongin, 2007]. Окислительный стресс является основной причиной поражения тканей при фототромботическом повреждении. АФК могут сами повреждать клетки, а также стимулировать пути гибели и выживания клеток. Примером мишеней, стимулируемых АФК, могут быть MAP-киназы, p38, JNK, NF- $\kappa$ B и AP-1 [Chen и др., 2011]. Эндоплазматический ретикулум, который является основным депо внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , может повреждаться АФК, что приводит к высвобождению данного иона в цитозоль. Повреждение митохондрий в

результате окислительного стресса приводит к высвобождению проапоптотических белков в цитозоль [Chen и др., 2011; Hayashi и др., 2005]. Окислительный стресс приводит к индукции апоптоза, который преобладает непосредственно в очаге ишемии и в зоне пенумбры, однако сильное повреждение может вызывать некроз клеток почки.

## **2.3. Терапевтические подходы к лечению ОПП.**

### **2.3.1. Профилактика и симптоматическая терапия ОПП.**

В связи с отсутствием эффективной патогенетической терапии ОПП, очень важна его профилактика. Одним из возможных подходов является оценка рисков развития ОПП и выявление пациентов с высоким риском почечных патологий. Особенно это важно в клинике, так как лечение ОПП на данный момент ограничивается снижением симптомов [Duann и др., 2016; Gonsalez и др., 2019]. ОПП является многофакторным заболеванием и зачастую вызвано сопутствующими патологиями, что представляет дополнительную сложность при лечении. На данный момент не существует фармакотерапии, который бы обращал повреждение почки. У пациентов с ОПП может развиваться гиперкалиемия, метаболический ацидоз, перегрузка объемом и/или симптомы уремии из-за снижения СКФ. Большая часть фармакологического лечения связана с ослаблением симптомов, возникающих в результате этих изменений.

У пациентов с высоким риском ОПП и тех, у кого уже установлен диагноз, должна тщательно контролироваться функция почек по концентрации  $sCr$  и диурезу. Следует проводить оценку состояния гемодинамики и лечение с помощью внутривенных жидкостей, диуретиков или препаратов гемодинамической поддержки. Так как снижение почечной перфузии является одной из причин развития ОПП, могут применяться диуретики, способствующие повышению почечного кровотока. Примером может служить маннитола, способствующий возвращению воды из тканей в сосудистое русло или фуросемид, который является петлевым диуретиком. Фуросемид реализует свой эффект за счет ингибирования симпорта  $Na^+-K^+-2Cl^-$  и увеличения экскреции  $Na^+$  и  $Cl^-$  [Bragadottir, Redfors, Ricksten, 2012; Putzu и др., 2017]. Снижению экскреции натрия также способствует использование атриального натрийуретического пептида. Он неспецифически ингибирует катионные каналы, а также увеличивает СКФ за счет влияния на

сосуды. Так, его применение вызывает вазодилатацию афферентной и вазоконстрикцию эфферентной артериол [Marin-Grez, Fleming, Steinhausen, 1986; Mitaka и др., 2014; Mitaka и др., 2017]. Агонисты дофаминергических рецепторов, такие как дофамин и фенолдопам в низких дозах, потенциально повышают почечный кровоток [Gillies и др., 2015; Joannidis и др., 2017; Yang и др., 2016]. Однако для большинства из этих подходов наблюдаются противоречивые данные, демонстрирующие как отсутствие влияния данных препаратов на развивающееся ОПП, так и улучшение и даже ухудшение состояния пациентов. Поэтому, в большинстве случаев тяжелого ОПП требуется применение заместительной почечной терапии (ЗПТ).

Улучшение почечной перфузии может быть достигнуто с помощью инфузионной терапии, например, с использованием физиологического раствора, физиологически сбалансированных солевых растворов или коллоидов. После значительных вливаний жидкости должна проводиться терапия вазопрессорами для избежания гипергидратации. На сосудистое сопротивление при ОПП может влиять снижение уровня NO и увеличение уровней вазоконстрикторов, например, ангиотензина II (Ang II) и эндотелина. Таким образом, применение соответствующих дилататоров может потенциально облегчить ОПП. Например, применение антагонист рецепторов Ang II или донора NO улучшали функцию почек на фоне И/Р [Moore, Hsu, Liu, 2018]. Повышение вазоконстрикции почечных сосудов опосредовано повышенным уровнем Ang II, и отсутствием вазодилататоров, таких как NO. Поддержание баланса вазоконстрикторами и вазодилататорами важно для поддержания сохранения нормального функционирования почек [Srisawat и др., 2015]. Именно поэтому в дополнения к мерам, направленным на улучшение почечной перфузии и восстановление баланса жидкости требуется лечение, направленное на модуляцию внутрпочечных патофизиологических механизмов, вовлеченных в развитие повреждения.

### 2.3.2. Возможные подходы терапии ОПП

На сегодняшний день не существует эффективной патогенетической терапии ОПП и способов его обращения ОПП. Кроме того, сама разработка лекарств, научные исследования и клинические испытания являются очень дорогими и длительными. Для ускорения процесса существует стратегия репозиционирования препаратов. Этот подход заключается в анализе данных по уже разработанным фармакологическим препаратам с целью поиска новых свойств, потенциально подходящих для терапии других заболеваний. В данной стратегии лучше выбирать вещества с хорошо изученным механизмом действия. Важной характеристикой также является низкий уровень побочных эффектов [Ashburn, Thor, 2004].

Несмотря на то, что некоторые антибиотики обладают выраженным нефротоксическим действием, они являются одной из групп рассматриваемых препаратов. Например, доксициклин - это тетрациклин, который обладает рядом фармакологических свойств в дополнение к антимикробному эффекту, например, может ингибировать матриксные металлопротеиназы (MMPs). Было продемонстрировано, что доксициклин предотвращает И/Р-индуцированный окислительный стресс, связанный с ингибированием MMPs, что приводит к снижению уровня провоспалительных цитокинов и возникновения апоптоза [Ihtiyar и др., 2011]. Кроме того, было высказано предположение, что предотвращение активации MMP является возможным механизмом защиты при трансплантации почки [Li и др., 2015a]. В модели И/Р внутрибрюшинное введение доксициклина в низких дозах защищало функцию почек (клубочковую фильтрацию и эпителиальный транспорт  $\text{Na}^+$ ), помимо его антимикробного действия [Cortes и др., 2018].

Одним из возможных подходов к терапии ОПП является модуляция окислительного стресса. При И/Р-повреждении особенно страдают митохондрии, что ведет к продукции АФК, что влияет на регуляцию внутриклеточных механизмов и сосудистый тонус [Majid, Nishiyama, 2002;

Silachev и др., 2014]. И/Р вызывает дефицит глутатиона, который участвует в защите от окислительного повреждения, и повышение уровня малонового диальдегида, что указывает на наличие перекисного окисления липидов [Ihtiyar и др., 2011; Kucuk и др., 2009]. Во время ишемии происходит накопление гипоксантина, а также преобразование ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу. При восстановлении кровотока в фазу реперфузии происходит повышение уровня АФК за счет метаболизирования гипоксантина ксантиноксидазой, что вызывает продолжение повреждения тканей [Collard, Gelman, 2001]. Исследования показывают, что некоторые антиоксиданты обладают потенциалом к облегчению ОПП за счет снижения окислительного стресса или воспаления, однако многие не улучшали ситуацию. Витамин С показывал некоторую эффективность в ОПП, связанном с эндотелиальной дисфункцией, однако возможно, что его действие связано не столько с антиоксидантной активностью, сколько с ролью ферментативного кофактора. Ренопротекторные эффекты аскорбата могут быть обусловлены его способностью утилизировать АФК, включая нерадикальные окислители, и/или поддержанием уровня глутатиона (GSH) для активности пероксидазы или ВН4 для функции eNOS. Аскорбат также может поддерживать ферменты, содержащие  $Fe^{2+}$  и  $Cu^{+}$  гидроксилазу и монооксигеназу, что положительно влияет на сосуды и микроциркуляцию. Последние играют важную роль в синтезе коллагена и вазопрессина, играющих центральную роль в структуре и функциональности сосудов, а также модулируют окислительно-восстановительные сигнальные пути, такие как HIF-1, снижающий активность воспаления [Dennis, Witting, 2017]. Митохондриально-направленный антиоксидант 10-(6'-пластохинонил)децилпроламином (SkQR1) продемонстрировал нефропротекторное действие, предотвращал развитие почечной сосудистой дисфункции, а также защищал клетки эндотелия от повреждения [Jankauskas и др., 2012; Jankauskas и др., 2016; Plotnikov и др., 2011].

Ишемическое прекондиционирование представляет собой предшествующее основному эпизоду ишемии воздействие на орган короткими периодами ишемии [Zager и др., 1984]. На почке данная методика осуществляется путем кратковременного пережатия сосудистого пучка почки и восстановления почечного кровотока, что приводит к кратковременным циклам ишемии и реперфузии. Предполагается, что перед основным эпизодом ишемии в ткани активируются защитные механизмы, которые обеспечивают [Dirnagl, Simon, Hallenbeck, 2003; Er и др., 2012]. Устойчивость к ишемии индуцируется регуляцией функции эндотелия, кровотока и снижением активности макрофагов и нейтрофилов. Это приводит к уменьшению повреждения эндотелия и, в конечном счете, к увеличению ишемической толерантности органа [Tarugia и др., 2008]. Кроме механического метода, описывают химический метод прекондиционирования, который заключается в использовании таких миметиков гипоксии. Например, использование хлорид кобальта или цинка защищало почку от повышения факторов, индуцированных гипоксией, HIF1 $\alpha$  and 2 $\alpha$  [Rao и др., 2017]. Кроме того, сейчас разрабатываются подходы отдаленного ишемического прекондиционирования, отличающиеся тем, что кратковременным эпизодам ишемии подвергаются отдаленные области, например, пережатие руки [Er и др., 2012]. Защитный эффект в данном случае обеспечивается высвобождением сосудорасширяющих веществ [Robert и др., 2017], а также аденозина и брадикинина, которые приводят к снижению проницаемости митохондрий, активных форм кислорода и воспалительной реакции [Crowley, McIntyre, 2013].

### **2.3.3. Подавление воспаления как стратегия терапии ОПП**

Так как воспаление является одним из ключевых звеньев в развитии и прогрессировании ОПП, а также в восстановлении органов после ОПП, воздействие на механизмы, задействованные в иммунном ответе, может рассматриваться как возможная терапевтическая стратегия лечения ОПП.

Например, они могут быть направлены на ингибировании высвобождения медиаторов воспаления или регуляции взаимодействия с рецепторами, синтеза молекул адгезии или непосредственно адгезии лейкоцитов к эндотелию [Collard, Gelman, 2001].

В целом, повышение уровня цитокинов, таких как хемокины, TNF- $\alpha$  или ICAM-1, связано с выраженным воспалительным ответом, наблюдаемым при ОПП. Соответственно, блокада этих цитокинов, их рецепторов или связанных сигнальных путей может снижать воспаление и связанное с ним повреждение почек. Так, было продемонстрировано, что нефропротекторным эффектом при ОПП обладали моноклональные антитела против ICAM-1, ингибитор CXCR4 (СХС хемокиновый рецептор 4) плериксафор и ингибитор TNF- $\alpha$  пентоксифиллин [Kelly и др., 1994; Kelly и др., 1996; Ramesh, Reeves, 2002; Zuk и др., 2014].

Некоторые цитокины обладают заметными ренопротективными эффектами, например, IL-10. Данный противовоспалительный цитокин ингибирует увеличение TNF- $\alpha$ , ICAM-1 и iNOS и защищает от ишемического и вызванного цисплатином ОПП [Deng и др., 2001]. В недавних работах кардиотрофин-1 (СТ-1), член семейства интерлейкина 6 (IL-6), показал значительные защитные эффекты при ОПП, вызванном контрастным средством [Quiros и др., 2013]. Более того, существуют цитокины, которые благоприятно влияют на гемодинамику или ангиогенез при ОПП и восстановлении почек после ОПП. Это хорошо иллюстрируется растворимым тромбомодулином (sTM) и олигомерным белком хрящевого матрикса-ангиопоэтином-1 (COMP-Ang1), которые улучшали скорость кровотока эритроцитов в микрососудах и снижали скатывание и прикрепление лейкоцитов к эндотелию микрососудов во время ишемического ОПП [Sharfuddin и др., 2009]. Улучшая перитубулярное капиллярное кровообращение и усиливая (повторное) кровоснабжение почечной ткани, эти

цитокины показали способность облегчать ишемическое повреждение почек [Jung и др., 2009; Kim и др., 2006].

#### **2.3.4. Влияние синаптамида на воспаление**

Производное омега-3 жирной кислоты синаптамид является этаноламидом докозагексаеновой кислоты, схожим по структуре с эндоканнабиноидом анандамидом. [Watson, Kim, Das, 2019]. Данное вещество является эндоканнабиноид-подобным лигандом, то есть имеет слабое сродство к рецепторам эндоканнабиноидов CB1 и CB2 (меньше, чем анандамид) [Kim, Spector, 2013]. Эндогенный этаноламин докозагексаеновой кислоты был обнаружен в головном мозге и сетчатке, а при приеме рыбьего жира его уровень повышался в жировой ткани, головном мозге, тощей кишке, и печени грызунов [Berger и др., 2001; Bisogno и др., 1999]. Несмотря на схожую с анандамидом структуру, эффекты синаптамида реализуются отлично от действия эндоканнабиноидов.

Синаптамид оказывает разнообразные эффекты на клетки различных органов. Так как он изучался в основном в контексте повреждения мозга, основные эффекты показаны на нейронах или нейроглие. Синаптамид обладал рядом нейрогенных, нейропротекторных, синаптогенных свойств. Было показано, что он стимулирует рост нейритов, синаптогенез, оцененный по уровню синапсина, глутаматергическую синаптическую активность, а также экспрессию глутаматных рецепторов в нейронах гиппокампа в концентрациях 10–100 нМ. Стоит отметить, что синаптамид действовал в более низких концентрациях, чем докозагексаеновая кислота. Также важно отметить, что в нескольких публикациях было показано отсутствие влияния ацилэтаноламидов других жирных кислот на рост нейритов и синаптогенез даже в более высоких концентрациях [Kim и др., 2011]. Кроме того, синаптамид увеличивал длину нейритов, экспрессию синаптических белков, синаптогенез и уровень цАМФ при действии на кортикальные нейроны, но при добавлении ингибитора аденилатциклазы данные эффекты не

наблюдались [Kwon и др., 2021]. При действии на нейрональные стволовые клетки (НСК) в течение 7 дней синаптамид индуцировал их дифференцировку, а также повышал экспрессию таких нейроспецифичных маркеров, как ассоциированный с микротрубочками белок 2 (MAP2) и бета-тубулин III класса (Tuj-1) [Rashid и др., 2013]. Также было показано, что синаптамид обращал негативные эффекты этанола на нейрогенную дифференцировку за счет увеличения выработки цАМФ и повышения экспрессии аденилатциклаз, угнетаемых этанолом, а также противодействует ингибирующему влиянию этанола на путь cAMP/PKA/CREB [Rashid, Kim, 2016].

Особое внимание стоит уделить противовоспалительным эффектам синаптамида и его влиянию на иммунные клетки. Обработка клеток ЛПС вызывает повышение продукции провоспалительных цитокинов, а синаптамид в дозе от 1 нМ до 10 мкМ снижал выработку как IL-6 и моноцитарный хемотаксический белок-1 (MCP-1), в клеточной культуре 3T3-L1 (адипоциты). Ингибиторный анализ показал, что данный противовоспалительный эффект был частично опосредован PPAR $\gamma$  и CB2 [Watson, Kim, Das, 2019]. Кроме того, синаптамид значительно ингибировал провоспалительную продукцию NO и MCP-1 в стимулированных LPS RAW264.7 и перитонеальных макрофагах. Обработка синаптамидом не подавляла активацию NF- $\kappa$ B или IFN- $\beta$ , которая ассоциирована с TLR3/TLR4 путями, а фармакологическое ингибирование показало, что рецепторы эндоканнабиноидов и PPAR $\gamma$  вносят минимальный вклад снижение NO [Meijerink и др., 2011; Watson, Kim, Das, 2019]. Также анализировалась влияние на клетки микроглии и было показано, что синаптамид не оказывал цитотоксического действия в дозах 0.01-10 мкМ. При применении максимальной концентрации увеличивалась экспрессию CD206, маркера противовоспалительной микроглии [Ponomarenko и др., 2021]. Кроме того, данное соединение подавляло ЛПС-индуцированную экспрессию мРНК и белков TNF и IL-1 $\beta$ , а использование антител к GPR110 блокировало эти эффекты, а также вызванное синаптамидом повышение цАМФ [Park, Chen, Kim, 2019]. На фоне действия ЛПС синаптамид также обращал

морфологические изменения микроглии, указывающие на активацию, снижал продукцию АФК, NO и нитритов, провоспалительного цитокина IL1 $\beta$ , экспрессию провоспалительного маркера микроглии CD86, экспрессию TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-6 и CCL2, а ингибиторы АС и РКА сигналинга отменяли эффекты синаптамида [Park и др., 2016; Ponomarenko и др., 2021]. Синаптамид увеличивал выработку антиоксидантного фермента СОД и восстанавливал антиоксидантную активность микроглии, которая значительно падает при действии ЛПС [Ponomarenko и др., 2021].

Эффекты синаптамида также демонстрировались на фоне повреждения в экспериментальных моделях на животных. При лечении синаптамидом в течение 7 дней у животных с травмой мозга уменьшалось количество Iba-1-положительных клеток, а также снижалась экспрессия Iba-1, что говорит о снижении нейровоспаления. Также, у мышей, получавших синаптамид наблюдалось снижение уровня провоспалительных цитокинов IL1 $\beta$  and IL6, а также маркер провоспалительно активированной микроглии CD86 [Ponomarenko и др., 2021]. У GPR110 нокаутных мышей не наблюдалось опосредованного синаптамидом снижения экспрессии провоспалительных цитокинов, что позволяет предполагать участие данного рецептора в механизме действия.

### **3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

#### **3.1. Содержание, уход за животными**

Эксперименты, выполняемые в рамках данной работы, проводились на беспородных белых крысах. Животные содержались в стандартных условиях вивария с 12-часовым световым режимом и постоянной температурой ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Крысы имели неограниченный доступ к воде и пище, стандартному корму для грызунов. В зависимости от задачи использовались или самцы крыс возрастом 3-4 месяца и массой 300-400 граммов или неонатальные крысы возрастом 3-7 дней. Эксперименты в рамках данной работы были одобрены Комиссии по регулированию экспериментальных исследований НИИ Физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского (протокол №3/19 от 18 марта 2019 г.).

#### **3.2. Моделирование повреждения почек**

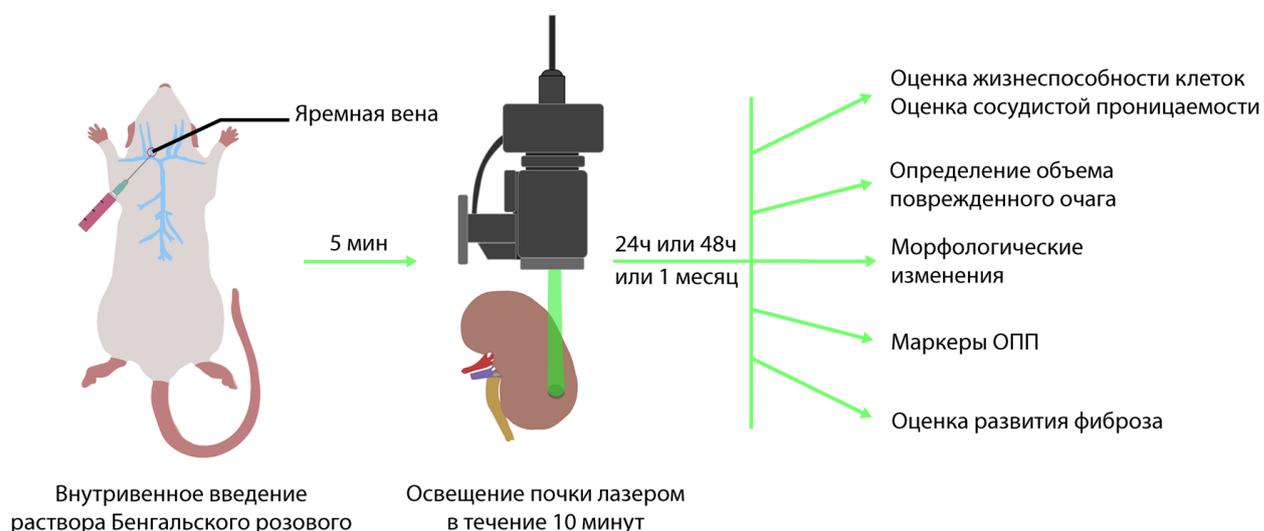
В связи с различной этиологией острого почечного повреждения в данной работе были использованы несколько моделей ОПП, а именно модели эндотоксинемического и И/Р-индуцированного повреждения, а также новая экспериментальная модель почечного повреждения, основанная на фототромбозе сосудов, разработанная в рамках данной работы.

##### ***3.2.1. Фототромбоз почки - новая экспериментальная модель ОПП***

В рамках данной работы была впервые разработана и охарактеризована новая экспериментальная модель почечного повреждения - индуцированная фотоактивированным тромбозом сосудов почки ишемия.

Эксперименты проводились на самцах беспородных белых крыс возрастом 3-4 месяца ( $n=62$ ). Перед операцией животных наркотизировали внутрибрюшинного (в/б) инъекцией 6% раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. Далее в яремную вену вводился краситель Бенгальский розовый (3%) в дозе 40 мг/кг, контрольным животным проводилась внутривенная инъекция физиологического раствора [Labat-gest, Tomasi, 2013; Moisenovich и др., 2020].

Затем крысы помещались на нагретый до 37 градусов коврик для поддержания постоянной температуры тела. После чего вскрывалась брюшная полость и освобождалась левая почка. После этого над нижней частью левой почки располагали лазер (520 нм, ~100 mW, диаметр луча 3 мм) на расстоянии от поверхности 2 мм. Через 5 минут после инъекции Бенгальского розового освещали почку лазером в течение 10 минут. После выключения источника зеленого света зашивали брюшную полость. Температура тела  $37 \pm 0.5$  °С поддерживалась с помощью нагреваемого коврика на протяжении всей операции. Образцы почек получали через 24 ч, 48 ч после моделирования ишемии почек, вызванной фототромбозом, для определения объема повреждения, морфологических изменений, маркеров ОПП в ткани почки, а также в моче и сыворотке. Через 1 месяц оценивали развитие фиброза, воспаления, а также объем повреждения. Чтобы вызвать увеличение фототромботического очага, мы следовали аналогичному протоколу, но использовали источник света с большим диаметром пучка (6 мм), а также проводили контралатеральную нефрэктомия. Краткая схема эксперимента представлена на рисунке 2.

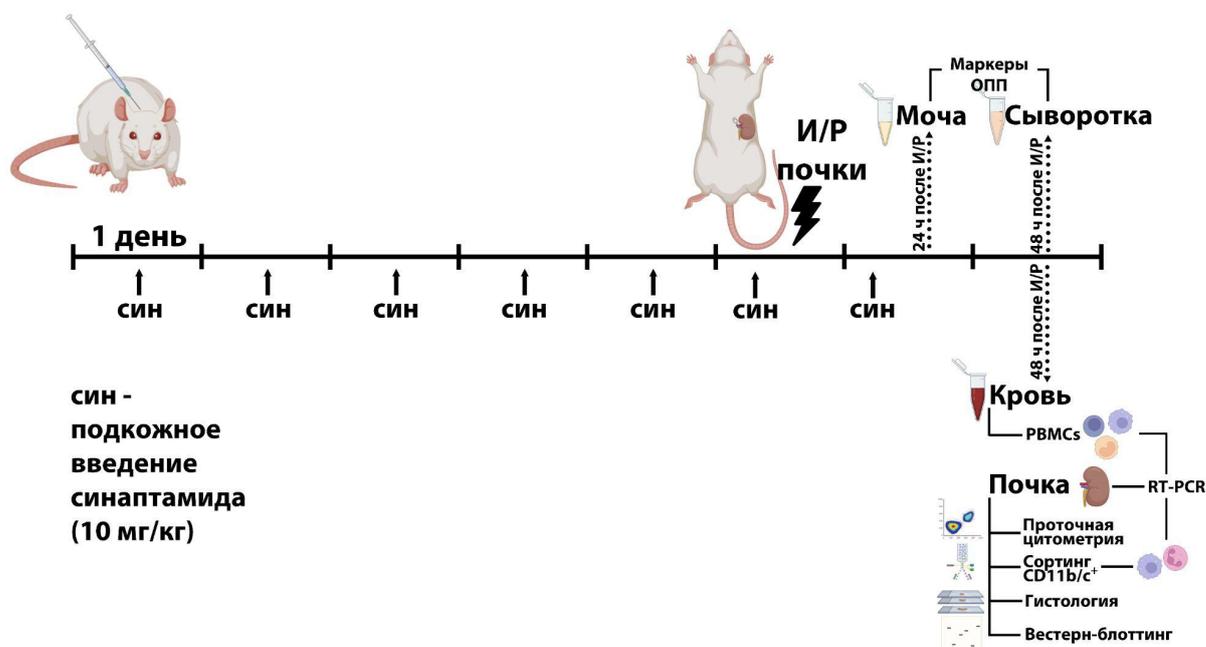


**Рис. 2.** Схема эксперимента по моделированию фототромбоза.

### ***3.2.2. Ишемия/реперфузия почки и терапия синаптамидом***

Экспериментальных животных наркотизировали и размещали на подогреваемом коврикe для поддержания постоянной температуры тела во время операции. Переднюю брюшную стенку освобождали от шерсти триммером или ножницами, после чего обрабатывали антисептиком. Далее делали разрез кожи, мышц и фиксировали края раны зажимами типа москит. После этого приступали к выделению левой почки, освобождению сосудистой ножки почки от жира и наложению микрососудистого зажима. На время периода ишемии (40 минут) устанавливали крысам ректальные термодатчики, подключенные к инфракрасным лампам, для поддержания температуры на уровне 37°C. Перед снятием зажима проводили нефрэктомию контралатеральной почки.

Часть животных перед И/Р получала терапию синаптамидом. Данное вещество было выделено дальневосточного кальмара как описано ранее [Latyshev, Ermolenko, Kasyanov, 2014; Tyrtysynaia и др., 2021]. Для получения стабильной рабочей эмульсии для введения аликвоты синаптамида размораживали и разводили с использованием нагретой до 37°C воды для инъекций, после чего перемешивали с помощью вортекса в течение 5 минут. За 5 дней до ишемии-реперфузии у крыс брали мочу и начинали подкожное введение раствора синаптамида в дозе 10 мг/кг один раз в день. Кроме того, синаптамид вводили в день операции (за 1 час до И/Р) и один день после операции. Дизайн эксперимента по оценке влияния синаптамида на ишемически-реперфузионное повреждение представлен на рисунке 3 (n=50).



*Рис 3. Схема эксперимента терапии синаптамидом в течение 7 дней с проведением И/Р на 5 день приема синаптамида и забором крови, мочи, сыворотки, почек и их клеточных суспензий для дальнейшего анализа*

### 3.2.3. ЛПС-индуцированное ОПП

Эндотоксинемическое ОПП моделировали путем внутрибрюшинного введения очищенного липополисахарида (ЛПС) *E. coli* штамма 0127:B8 (Sigma, США), контрольной группе вводили стерильный физиологический раствор. Разным группам вводили ЛПС в дозе 4 мг/кг, 2 мг/кг, а также проводили терапию антибиотиком гентамицином в дозе 50 мг/кг через сутки после ЛПС или 150 мг/кг через 1 час после ЛПС (n=60). Через 24 часа или 48 часов после введения ЛПС забирали мочу, кровь, почки для анализа на маркеры ОПП, клеточной пролиферации и активации апоптоза.

### 3.3. Клинические данные пациентов.

В течение 3 лет у 44 новорожденных пациентов отделения неонатальной хирургии Национального медицинского исследовательского Центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова были собраны образцы мочи и крови для анализа. В данное исследование вошли пациенты обоих полов в возрасте от рождения до 1 месяца,

проходившие лечение после восстановления врожденных дефектов внутренних органов. Во время антибактериальной терапии новорожденные получали амоксициллин в комбинации с клавулановой кислотой (в форме Амоксиклава®) по 30 мг/кг/сут, гентамицином 5-7,5 мг/кг/сут, ванкомицином 20-30 мг/кг/сут, цефепимом 100 мг/кг/сут, линезолидом (в форме Zyvox®) 0,2 % 30 мг/кг/сут, меропенем 60 мг/кг/сут, нетилмицин (веро-нетилмицин) 6 мг/кг/сут, ампициллин в комбинации с сульбактамом (в форме Амписида®) 75-150 мг/кг/сут, метронидазол 0,5 % 15 мг/кг/сут, цефоперазон в комбинации с сульбактамом по 100 мг/кг/сут, имипенем в комбинации с циластатином (в форме Тиенама®) по 60 мг/кг/сут или амикацином по 15 мг/кг/сут. Было получено информированное согласие родителей всех пациентов на исследование, которое было одобрено научно-исследовательским советом Центра в соответствии с Законом Российской Федерации "О здравоохранении". Клинический анализ мочи, биохимические анализы крови и другие анализы проводились неонатологами каждые 1-2 дня для оценки состояния здоровья пациентов и коррекции лечения антибиотиками. Образцы мочи для вестерн-блоттинга и ИФА собирались в динамике каждые 3-5 дней на протяжении всего периода госпитализации пациентов. У всех пациентов ежедневно контролировалась температура тела. Оценку функции почки проводили по уровню мочевины в сыворотке крови.

#### **3.4. Диагностика ОПП**

Диагностику ОПП проводили с использованием маркеров почечной дисфункции и повреждения. Через сутки после И/Р у крыс собирали мочу для оценки uNGAL или uKIM-1 методом вестерн блоттинга. Через 2 суток после повреждения кровь отбирали из сонной артерии, оставляли на 15 минут на комнатной температуре для формирования сгустка, после чего центрифугировали при 5000 rpm в течение 10 минут, отбирали сыворотку для анализа на анализатор AU480 (Beckman Coulter, США). Кроме того, через 2

суток после И/Р, а также у интактных животных забирали образцы почек для последующего вестерн блоттинга.

### **3.5. Микро-КТ**

Для проведения микро-КТ-анализа крысам транскардиально вводили 100 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), а затем 100 мл 4 %-ного забуференного раствора свежеприготовленного параформальдегида. Левую почку удаляли и фиксировали в 4 % растворе параформальдегида в течение 24 ч. После этого образцы обезживали и окрашивали йодом для контрастирования всей почки. Эта процедура включала дегидратацию в градуированном этаноле (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 % по объему) в течение 1 часа для каждого этапа. После дегидратации образцы инкубировали в абсолютном этаноле с 1 %-ным содержанием йода в течение 30 ч, промывали и хранили в абсолютном этаноле при температуре 5°C.

Для получения трехмерных изображений почек использовали лабораторный микро-компьютерный томограф Bruker Skyscan 1276 (Bruker, Бельгия). Образцы сканировали с воксельным разрешением 8-10 мкм при напряжении 90 кВ и мощности источника 200 мкА и применяли алюминиево-медный фильтр (AlCu). Все образцы были отсканированы и реконструированы в программном обеспечении NRecon (Bruker, Бельгия) с одинаковыми параметрами. Полученные микро-КТ-изображения были проанализированы в программном обеспечении ORS Dragonfly 2021.3 (ORS inc, Канада) тремя способами: двух- и трехмерная визуализация, расчет объема почки и очага поражения, а также анализ серого цвета различных частей органа.

### **3.6. Тест на жизнеспособность клеток**

Очаг повреждения визуализировали путем окрашивания целой почки 1%-ным хлористым 2,3,5-трифенил-2Н-тетразолий хлоридом (ТТС), разведенным на среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), в течение 20 минут при комнатной температуре. Бесцветный ТТС восстанавливается в

живых клетках до красного формазана, а мертвые ткани остаются неокрашенными. После инкубации с красителем почки омывали в среде DMEM и фотографировали [Benedek и др., 2006]. Оценку проводили визуально в контроле, а также через 24 и 48 ч после индукции фототромбоза почки.

### **3.7. Оценка проницаемости сосудов**

Проницаемость сосудов оценивали по проникновению красителя Эванса синего из кровотока в ткань почки. Для этого крысам через 24 или 48 ч после фототромбоза вводился Эванс синий (0,5%), через 30 минут после инъекции проводили транскардиальную перфузию животного фосфатно-солевым буфером для вымывания красителя, извлекали почку и проводили визуальную оценку появления Эванса синего в зоне очага повреждения

### **3.8. Гистологические исследования**

Почки, фиксированные в параформальдегиде, были залиты в парафин и изготовлены на микротоме. Толщина полученных срезов составляла около 4 мкм. Далее проводился ряд окрашиваний:

- 1) Гематоксилин и эозин (H&E) включал инкубацию в гематоксилине в течение 5 минут, помывку в проточной воде (5 минут) и окрашивание в 1% раствор эозина В в течение 10 минут.
- 2) Martius yellow-brilliant crystal scarlet-methyl blue (MSB) окрашивание требовало инкубации депарафинизированных срезов в смеси Буэна при 56 °С в течение 1 часа. Затем срезы окрашивали гематоксилином по Вейгерту (5 минут), промывали в проточной воде, обрабатывали 95% этанолом, окрашивали в 0.5% раствор Мартиуса желтого (2 минуты), промывали дистиллированной водой, окрашивали в 1% растворе бриллиантового кристаллического красного (10 минут), промывали дистиллированной водой, обрабатывали 1% раствором фосфорновольфрамовой кислоты для вымывания красного цвета из

периваскулярного пространства, промывали в воде, окрашивали в 0.5% растворе метиленового синего и промывали в 1% уксусной кислоте.

- 3) ШИК-реакция включала окисление срезов 0.5% периодной кислотой в течение 5 минут, окраску реактивом Шиффа и докрасшивание ядер гематоксилином.
- 4) Окрашивание на ретикулин (Гордону-Свиту) проводилось на депарафинированных срезах, которые инкубировали в 1% растворе перманганата калия в течение 5 минут, промывали в проточной воде, инкубировали в 1% растворе щавелевой кислоты, снова промывали в проточной воде и инкубировали в 2.5% растворе железных квасцов в течение 30 минут. После последней обработки срезы промывали в трех порциях дистиллированной воды, помещали в банку Коплина с раствором аммонийного серебра на 13 секунд, быстро промывали в дистиллированной воде и восстанавливали в 10% водном растворе формалина в течение 2 минут. После промывки в проточной воде срезы обрабатывали 5% раствором тиосульфата натрия в течение 3 минут.
- 5) Перед окрашиванием по Массону срезы окрашивали гематоксилином по Вейгерту в течение 5 минут. Затем промытые срезы окрашивали в растворе красных красителей (10 минут), быстро промывали водой, обрабатывали 1% раствором фосфомолибденовой кислоты в течение (5 минут) и окрашивали 2% раствором анилина синего (5 минут).
- 6) Перед окрашиванием пикро-полихром срезы окрашивали гематоксилином по Вейгерту в течение 5 минут. Затем промытые срезы окрашивали в 0.25% водном растворе метанилового желтого в течение 2 минут, дифференцировали в подкисленной воде, промывали в дистиллированной воде, обрабатывали карбонатом лития. Далее следовала окраска в растворе пикро-полихромома, содержащем метиленовый синий, кислый фуксин, глицерин и карбонат лития, в

течение 2 минут, а затем держали в 1% уксусной кислоте в течение 2 минут.

- 7) Метод по Коссу заключался в инкубации срезов в 3% растворе нитрата серебра при ярком свете, фиксации в 5% растворе тиосульфата натрия и окрашивании ядерным красным.

Все окрашенные срезы дегидратировали в спиртах, очищали в ксилоле и заключали их под покровное стекло [Luna, 1992; Suvarna, Layton, Bancroft, 2012]. Окрашенные срезы почек рассматривали на микроскопе Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия) с камерой MRc.5 (Carl Zeiss, Германия), проводили съемку срезов почек и описывали морфологические изменения, происходящие в очаге повреждения и окружающих тканях.

### **3.9. Иммуногистофлуоресцентное окрашивание (ИГФ)**

Перед проведением иммунофлуоресцентного окрашивания срезы депарафинизировали и гидратировали через градуированные ксилолы и этанол. Для восстановления антигенов срезы помещали в стакан с буфером Tris-EDTA (20 mM Tris Base, 1 mM EDTA, 0.1% Tween 20, pH 8.0) и инкубировали при 95 °C в течение 20 минут. Затем срезы охлаждали до температуры 60 °C. Пермеабелизацию и блокировку проводили с использованием 0.1% Triton X-100 и 1% бычьего сывороточного альбумина в PBS при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем срезы инкубировали в течение ночи при 4 °C с первичными антителами против  $\beta$ -актина (A2228, Sigma, США), молекулы повреждения почек (KIM-1) (MAA785Ra21, Cloud Clone Corp., КНР) или антигена пролиферирующих клеток (PCNA) (13110, Cell Signaling, США). В случае двойного окрашивания инкубацию с первичными антителами проводили одновременно. Затем срезы промывали 3 раза по 5 минут в PBS и инкубировали в течение 1 часа с вторичными антителами: конъюгированными с FITC козьими анти-мышинными антителами (115-095-146, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Великобритания), конъюгированными с FITC козьими анти-кроличьими

антителами (111-095-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Великобритания), конъюгированными с AlexaFluor 568 козьими анти-мышинными антителами (A-11031, Thermo Fisher Scientific, США), конъюгированными с AlexaFluor 568 козьими анти-кроличьими антителами (A-11036, Thermo Fisher Scientific, США). Срезы промывали 3 раза по 5 минут в PBS, добавляли среду заключения Fluoroshield (Sigma, США), накрывали покровным стеклом и исследовали на инвертированном конфокальном микроскопе LSM900 (Carl Zeiss, Германия). Количественный анализ конфокальных изображений проводился с использованием программы с открытым исходным кодом Fiji/ImageJ (версия 2.9.0). В почке каждой крысы было снято 3–5 полей зрения; данные анализа изображений представлены на графиках для всех полей зрения всех крыс в экспериментальной группе. Количественная оценка в случае маркера KIM-1 заключалась в измерении средней интенсивности флуоресценции каждого поля зрения среза. Также мы подсчитывали количество PCNA-положительных клеток, нормированное на общее количество ядер, оцененное с помощью окрашивания DAPI, для каждого поля зрения.

Для иммуноокрашивания по пероксидазному методу депарафинированные и дегидратированные срезы, фиксированные в параформальдегиде, обрабатывали 1×цитратным буфером для демаскирования антигенов (pH 6.0) в течение 10 минут при температуре 95° °C и охлаждали в течение 30 минут. Дальнейшие этапы включали 3 промывки в дистиллированной воде, инкубацию в 3% растворе перекиси водорода в течение 10 минут и промывали в PBS в течение 5 минут. Блокировка проводили с использованием 1 % бычьего сывороточного альбумина в PBS при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем срезы инкубировали с 100 мкл первичных антител против CD163 (ab182422, Abcam, Великобритания) и против активированной каспазы-3 (9664, Cell Signaling, США), разведенных 1:250 в растворе для разведения антител (№8112,

SignalStain, США) в течение ночи при 4 °С. После инкубации срезы промывали в PBS три раза по 5 минут, добавляли реагент для усиления сигнала (HRP, Rabbit, №8114, SignalStain®, США) и инкубировали во влажной камере при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем срезы обрабатывали смесью концентрата хромогена DAB и разбавителя DAB (SignalStain, США) в течение 10 минут. Окрашенные срезы промывали в воде, окрашивали гематоксилином в течение 5 минут, дегидратировали 2 раза в 95 % этаноле, 2 раза в ксилоле и заключали под покровное стекло. Окрашенные срезы почек наблюдали с использованием микроскопа Axio Scope A1 с камерой MRc5 [Brezgunova и др., 2023].

### **3.10. Забор образцов для электрофореза и вестерн-блоттинга.**

У новорожденных и взрослых крыс образцы мочи собирали прижизненно непосредственно в пробирку, высаживание в металлический поддон или забирали с помощью шприца из мочевого пузыря после декапитации. К отобранным пробам добавляли 1mM ингибитора протеаз PMSF, вортиксировали. Часть образца отбирали и добавляли равный объем 2-кратного буфера для образцов (SB), кипятили пробы в твердотельном термостате при 99°C, после чего замораживали.

Кровь отбирали из сонной артерии у взрослых крыс и тотально после декапитации у новорожденных крыс и оставляли на 15 минут на комнатной температуре для формирования сгустка, после чего центрифугировали при 3000 g в течение 10 минут, отбирали сыворотку для анализа и замораживали.

Гомогенизацию почек проводили с помощью ручного гомогенизатора в 1 мл PBS с добавлением 1 mM ингибитора протеаз PMSF для почек новорожденных крыс и в 5 мл PBS + PMSF для почек взрослых крыс, после чего центрифугировали полученный гомогенат 1000 g 3 минуты при +4°C для удаления крупных фрагментов ткани. Образовавшийся после центрифугирования супернатант отбирали для измерения концентрации белка с помощью набора с бичинхониновой кислотой (SigmaAldrich, USA) и для

приготовления образцов для электрофореза по Лэммли, для чего отбирали 300 мкл супернатанта, добавляли к ним 4-кратный SB и нагревали 5 минут при 99°C, после чего замораживали.

### **3.11. Подготовка проб к проведению электрофореза.**

Образцы мочи, смешанные с 2-кратным SB, кипятили 5 минут при 99°C, после чего центрифугировали 10000 g 3 минуты для удаления нерастворимых агрегатов белка. Для проведения электрофореза в полиакриламидный гель наносили по 20 мкл каждого образца мочи.

Сыворотку для анализа на вестерн-блоте разводили в PBS в 70 раз, добавляли 4-кратный буфер SB и кипятили 5 минут при 99°C. После кипячения центрифугировали образцы 10000 g 3 минуты, на фореz наносили по 5 мкл каждого образца.

Гомогенаты почек, уже смешанные с 4-кратным SB, разводили 1-кратным SB до концентрации общего белка, равной 2 мг/мл. Перед электрофорезом образцы центрифугировали при 10000×g в течение 5 мин и наносили на 15% полиакриламидный гель, приготовленный с Трис и глицином. Для электрофореза наносили по 20 мкл на каждую дорожку полиакриламидного геля в случае образцов мочи и по 10 мкг белка на дорожку в случае образцов почек. В качестве маркеров на фореz наносили биотинилированные маркеры (Cell Signaling Technology, USA)

### **3.12. Вестерн-блоттинг**

После проведения электрофореза осуществляли полусухой электроперенос на мембрану из поливинилиденфторида (Amersham Pharmacia Biotech, UK) при силе тока 1А в течение 30 мин (Trans Blot Turbo, BioRad, США). Для предотвращения неспецифического связывания антител блокировали мембраны в течение 1 ч при комнатной температуре в 5% обезжиренном сухом молоке, приготовленном на PBS с добавлением 0,05% Tween-20 (PBST).

В моче детектировали появление при ОПП белков NGAL и KIM-1 с помощью специфических антител (NGAL - ab63929, Abcam, США, KIM-1 - MAA785Ra21, Cloud-Clone Corp., USA). В сыворотке анализировали уровень маркера цистатин С (ab109508, Abcam, США). В гомогенатах почки оценивали пролиферативную активность клеток по уровню белка PCNA (sc-7907, Santa Cruz, США), и активацию апоптоза по содержанию расщепленной (активированной) каспазы-3 (9661, Cell signaling technology, США), TNF- $\alpha$  (ab66579, Abcam, США) и IL-6 (SAB5700632, Sigma, США).

После блокировки мембраны 2 раза отмывали мембраны в PBST и проводили инкубацию с первичными антителами, разведенными на 0,1% БСА в PBST в течение ночи при +4°C. На следующий день проводили отмывки от первичных антител и проводили инкубацию со вторичными антителами конъюгированными с пероксидазой хрена (P-GAR Iss или P-GAM Iss, ИМТЕК, Россия), в разведении 1:5000 в PBST. Для проявки маркеров молекулярных весов использовали антитела против биотина, конъюгированные с пероксидазой хрена. Полосы детектировали с помощью хемилюминесцентного субстрата Advansta Western Bright ECL (Advansta, USA). Детекцию сигнала проводили с помощью прибора ChemiDoc MP ImagingSystem (Bio-Rad, США), после чего изображения анализировали с помощью программы ImageLab или ImageJ.

### **3.13. Проточная цитофлуориметрия и сортировка клеток.**

Для приготовления суспензии клеток из почек контрольных крыс, а также через 2 суток после И/Р или И/Р и введения синаптамида почка выделялась, аккуратно нарезалась скальпелем на небольшие кусочки на стекле. Полученные кусочки почки помещались в специальные камеры для дезагрегации тканей, пропускалась через MediMachine (BD, США), в результате чего была получена суспензия клеток. Для избавления от крупных неизмельченных фрагментов, суспензия пропускалась через фильтр 40 мкм. Для окрашивания клеточной поверхности использовались

моноклональные антитела анти-CD11b/c-PE (Miltenyi Biotec, Германия). Для этого клетки инкубировали с антителами при температуре +4°C в течение 20 минут, промывали в PBS и анализировали на клеточном сортере FACSAria SORP (BD Biosciences, США). Для анализа данных использовалось программное обеспечение Diva (BD Biosciences, США). CD11b/c-положительные клетки сортировали с использованием клеточного сортера FACSAria SORP (BD Biosciences, США) с использованием сопла диаметром 70 мкм и соответствующих параметров давления.

### **3.14. ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)**

Для количественной ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией были собраны образцы почек и крови, а также фракция CD11b/c<sup>+</sup>, полученная с помощью сортирования.

Ткань почки гомогенизировали в соответствующем объеме реагента Trizol (Thermo Fisher Scientific Inc., Invitrogen, США) с использованием гомогенизатора Поттера. После выделения водной фазы, содержащей нуклеиновые кислоты, с использованием хлороформа и обработки 75% этанолом, последующие этапы выделения общей РНК и обработки ДНКазой проводились с использованием набора RNeasy plus mini kit (QIAGEN GmbH, Германия) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. После экстракции РНК концентрация и чистота были определены с помощью NanoPhotometer (Implen, Германия) путем измерения концентрации РНК и чистоты по соотношениям A260/A280 и A260/A230.

ПЦР в реальном времени проводили с использованием ПЦР-амплификатора CFX96 Touch (Bio-Rad, США) и SYBR Green I (Bio-Rad, США). Все образцы были проанализированы в тройных повторностях. Праймеры, (DNA-synthesis, Россия), использованные в данной работе (Таблица 1), были разработаны с использованием программы Beacon Designer 7 (Premier Biosoft Int., США). Специфичность праймеров была оценена с

помощью анализа кривой плавления. Эффективность праймеров была рассчитана путем построения стандартной кривой для каждого целевого гена с использованием пятикратного серийного разведения кДНК и находилась в диапазоне 1.8–2.0. Уровни экспрессии мРНК рассчитывались как  $E^{-\Delta Ct}$ , где E — это эффективность праймера, а Ct — это номер цикла, на котором флуоресценция продукта превышала пороговый уровень. Эти значения нормализовали к пороговым циклам гипоксантинфосфорибозилтрансферазы 1 (HPRT), полиубиквитина-С (UBC) или Рибосомальный белок большой субъединицы, P0 (RPLP0).

Образцы крови были собраны у анестезированной крысы через яремную вену с использованием шприца с раствором гепарина (1000 МЕ). Полученный образец крови был затем наложен на раствор фикола и центрифугирован при 600 g в течение 30 минут. После центрифугирования сыворотка отбиралась с помощью аспиратора, а кольцо, содержащее мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), было аккуратно собрано с помощью пипетки и затем перенесено в 10-кратный объем буфера RLT из RNeasy plus mini kit. Экстракция РНК выполнялась в соответствии со стандартным протоколом RNeasy plus mini kit (74104, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) для тканей животных.

**Таблица 1. Последовательность праймеров, использованных для оценки экспрессии мРНК генов.**

Название гена	Последовательность прямого праймера 5'- к 3'	Последовательность обратного праймера 5'- у 3'
<i>C3</i>	AAGCCCAACACCAGCTACATC	ACTTCTGATCCTGGCATTCTTCT
<i>CD11a</i>	TGGCAGATGTGGTTGTAGG	TCTGGAAGCACACCTTGAG
<i>CD45</i>	AAGCAATACCACCACAAGCACAG	TGGAGTACATGAGCCATTGGAGAG
<i>CD68</i>	TTGAACCCGAACAAAACCAAGGTC	GAGAATGTCCACTGTGCTGCTTG

<i>CD86</i>	TCAGATGCTGTTCCCTGTGAAGAGG	TGAAGTCGTAGAGCCTGGTTATCC
<i>CD163</i>	ACAACCGATGCTCAGGAAGAGTAG	CAAGCCAGATTTGTCCAGAACCAG
<i>CXCL1</i>	GTGGCAGGGATTCACTTCAAGAAC	GGGACACCCTTTAGCATCTTTTGG
<i>COX-2</i>	TACGTGTTGACGTCCAGATC	TGGAGAAAGCTTCCCAACTT
<i>GPR110</i>	CATACATAGGGCTGGGCGTCTC	TTGCGTGTGTAGGAGGTTTGGC
<i>HPRT</i>	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGC C
<i>IL-1b</i>	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC
<i>IL-6</i>	CTGGTCTTCTGGAGTTCCGT	TGGTCTTGGTCCTTAGCCAC
<i>IL10</i>	GCTGAAGACCCTCTGGATAC	CCAGGCTTACCTTATTAATAATCAT TC
<i>iNOS</i>	CCACAATAGTACAATACTACTTGG	ACGAGGTGTTTCCAGCGTGCTCCACG
<i>KIM-1</i>	AGGAAGCCGCAGAGAAAC	ATAATGATGTACCTGGTGACAAC
<i>RPLP0</i>	CACAGTACCTGCTCAGAACAC	ACCTTGTCTCCAGTCTTTATCAG
<i>TGFβ1</i>	CTACGCCAAAGAAGTCACC	CACTGCTTCCCGAATGTC
<i>TNF-α</i>	CAAGGAGGAGAAGTTCCCAA	TGATCTGAGTGTGAGGGTCTG
<i>UBC</i>	TCGTACCTTTCTCACCACAGTATCTAG	GAAAACCTAAGACCCTCCCATCA

### 3.15. Статистический анализ

Обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 9. Данные выборки были проверены на нормальное распределение с помощью теста Шапиро-Уилка. Для выявления отличий между группами в зависимости от

задачи и нормальности распределения данных использовали разные статистические тесты. Для сравнения двух групп использовали непарный t-тест в случае параметрических переменных и U-тест Манна–Уитни в случае непараметрических переменных. Для сравнения между несколькими группами использовался однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с post-hoc тестом Тьюки в случае параметрических переменных и тест Краскела–Уоллиса с тестом Данна для множественных сравнений в случае ненормально распределенных данных.  $p < 0.05$  считали статистически значимым. Значения внутри группы выражены как средние  $\pm$  стандартная ошибка средней (SEM). Данные клинических пациентов были обработаны с использованием модулей Python NumPy, SciPy и Pandas. Для проверки линейных зависимостей мы использовали корреляционный тест Пирсона (на диаграммах показан коэффициент корреляции и соответствующее значение  $p$ ). Для проверки различий в применении антибиотиков в группах мы использовали t-критерий неравных дисперсий Уэлча (на диаграммах показаны значения  $p$ , где это применимо).

## **4. РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **4.1. Разработка новой экспериментальной модели почечного повреждения**

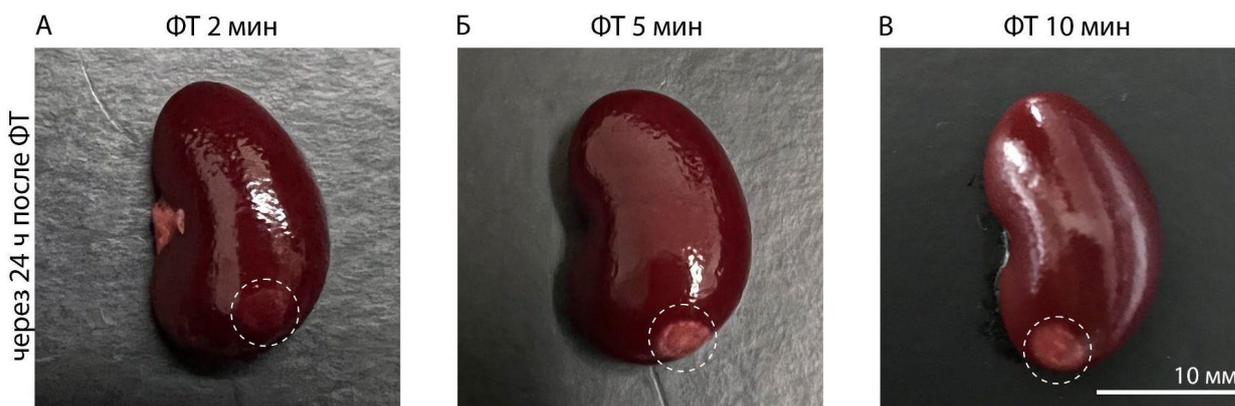
В настоящее время ОПП является значимой клинической проблемой, в связи с чем на ней сосредоточено вниманием многих исследователей, которые моделируют почечное повреждение с использованием широкого спектра экспериментальных моделей. Однако, несмотря на это, еще не до конца выяснены механизмы развития ОПП и отсутствует эффективная патогенетическая терапия данного состояния. В связи с этим необходима разработка новых экспериментальных моделей данной патологии.

В рамках данной работы была разработана новая экспериментальная модель почечного повреждения, основанная на фотоиндуцированном тромбозе сосудов почки. За основу была взята модель фототромбоза, которая широко используется для моделирования очаговой ишемии мозга. Для адаптации модели фотоиндуцированного тромбоза сосудов, инициируемого световой активацией молекул фотосенсибилизатора Бенгальского розового, необходимо было выбрать оптимальное время освещения почки лазером и диаметр луча, доза Бенгальского розового была выбрана на основании литературных данных.

#### **4.1.1. Подбор экспериментального дизайна модели фототромбоза**

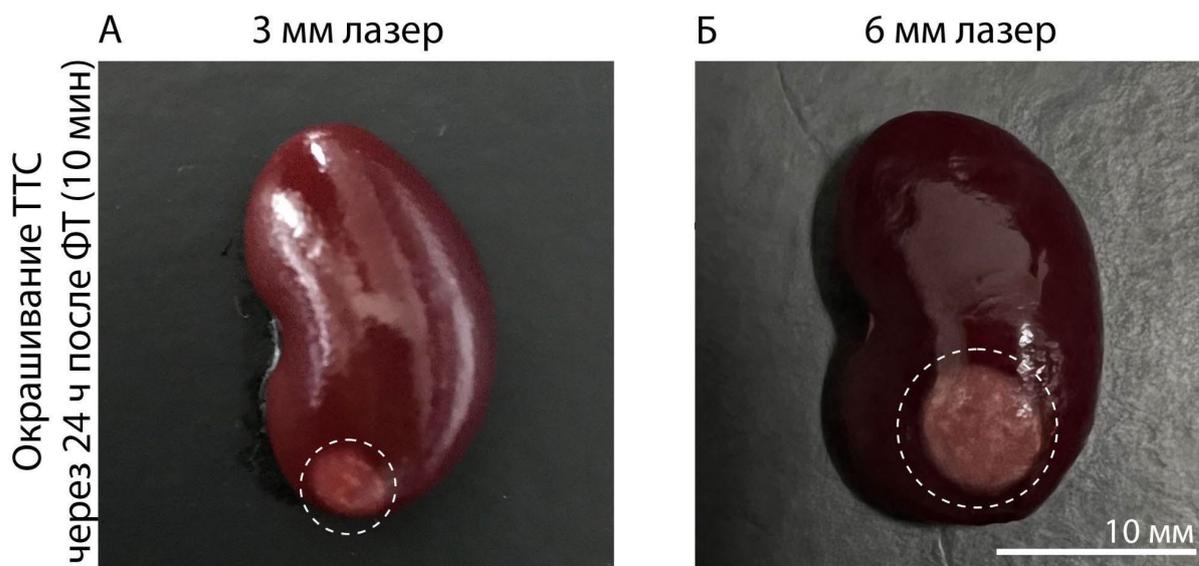
Были протестированы времена освещения почки лазером 2, 5 и 10 минут. Оценку развития очага проводили через 24 часа после индукции повреждения путем окрашивания целой почки с помощью ТТС. Данный краситель является бесцветным, но может проникать в живые клетки и метаболизироваться ими до формазана, имеющего ярко-красную окраску. Поврежденная же область остается неокрашенной, ярко контрастируя с окружающей живой тканью. Мы показали, что время освещения почки лазером положительно коррелирует с объемом поврежденного очага (Рис. 4). Короткое время воздействия (2 минуты) привело к развитию чуть меньшего очага, по сравнению с очагами

при 5 и 10-минутном освещении почки лазером, между рамерами которых не визуализировалось явной разницы, что может говорить о достижении плато. Таким образом, время воздействия источником освещения на почку может варьироваться исследователями для достижения нужного размера очага, но до определенного предела.



*Рис. 4. Оценка развивающегося очага фототромбоза при времени освещения почки лазером 2, 5 и 10 минут путем прижизненного окрашивания почки ТТС ( $n = 3$  в каждой группе).*

Кроме того, разного размера очага можно добиться при использовании источников освещения разного диаметра. Было протестированы два источника освещения с разными диаметрами, а именно 3 и 6 мм. При использовании источника освещения с диаметром 6 мм удается получить значительно больший очаг (Рис. 5). Это может быть полезно, если исследователям важно получить более выраженное повреждение, которое будет влиять на уровень маркеров острого почечного повреждения, например, сывороточных креатинина и мочевины.



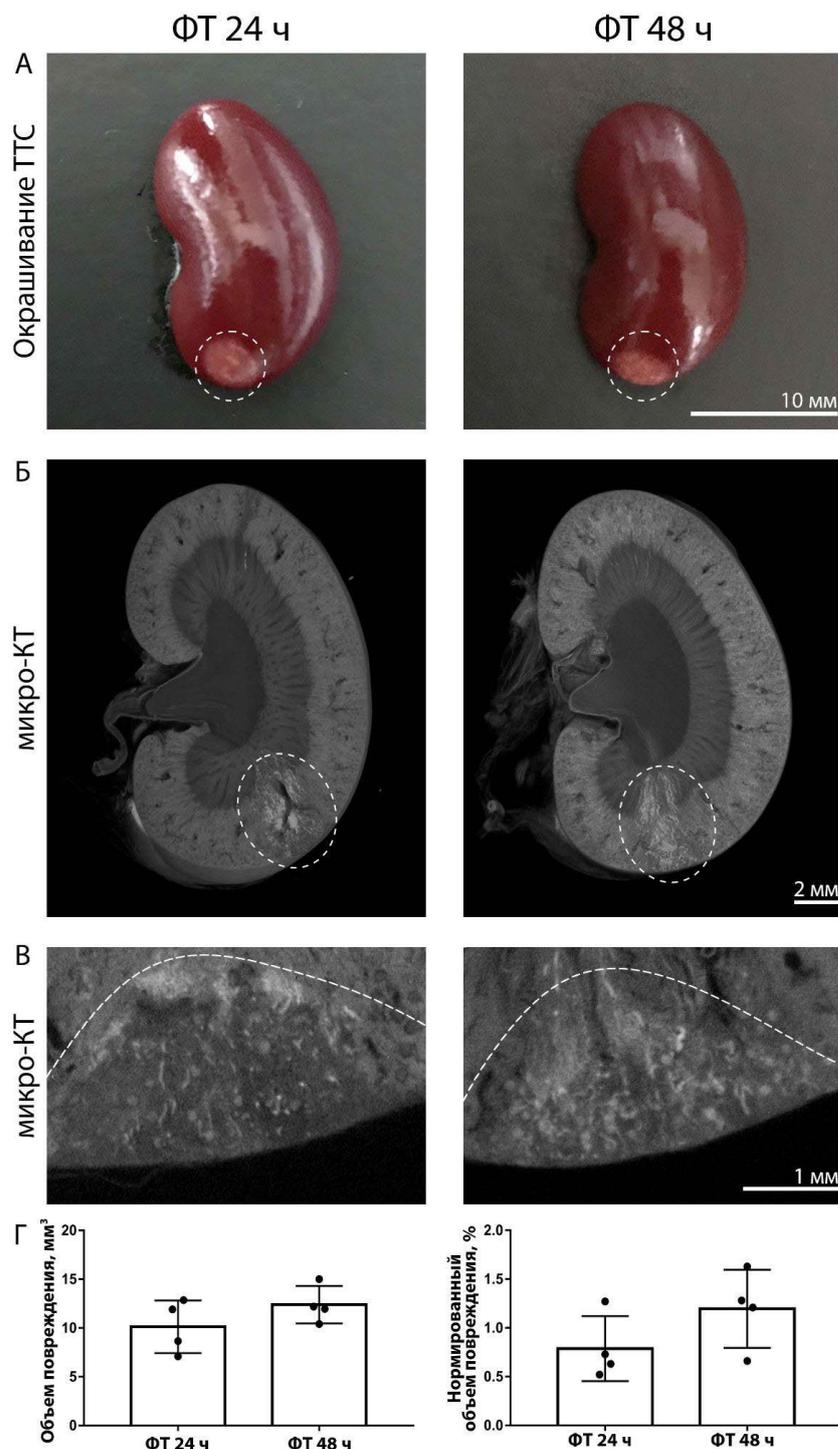
*Рис 5. Оценка развивающегося очага фототромбоза при освещении почки лучом диаметром 3 ( $n=3$ ) и 6 мм ( $n=3$ ) путем прижизненного окрашивания почки ТТС.*

Для нашей работы и характеристики модели были выбраны время освещения почки лазером 10 минут, диаметр луча 3 мм, и дальнейшие результаты будут представлены для этого экспериментального дизайна, если не сказано иное.

#### ***4.1.2 Макроскопические изменения в зоне поврежденного очага.***

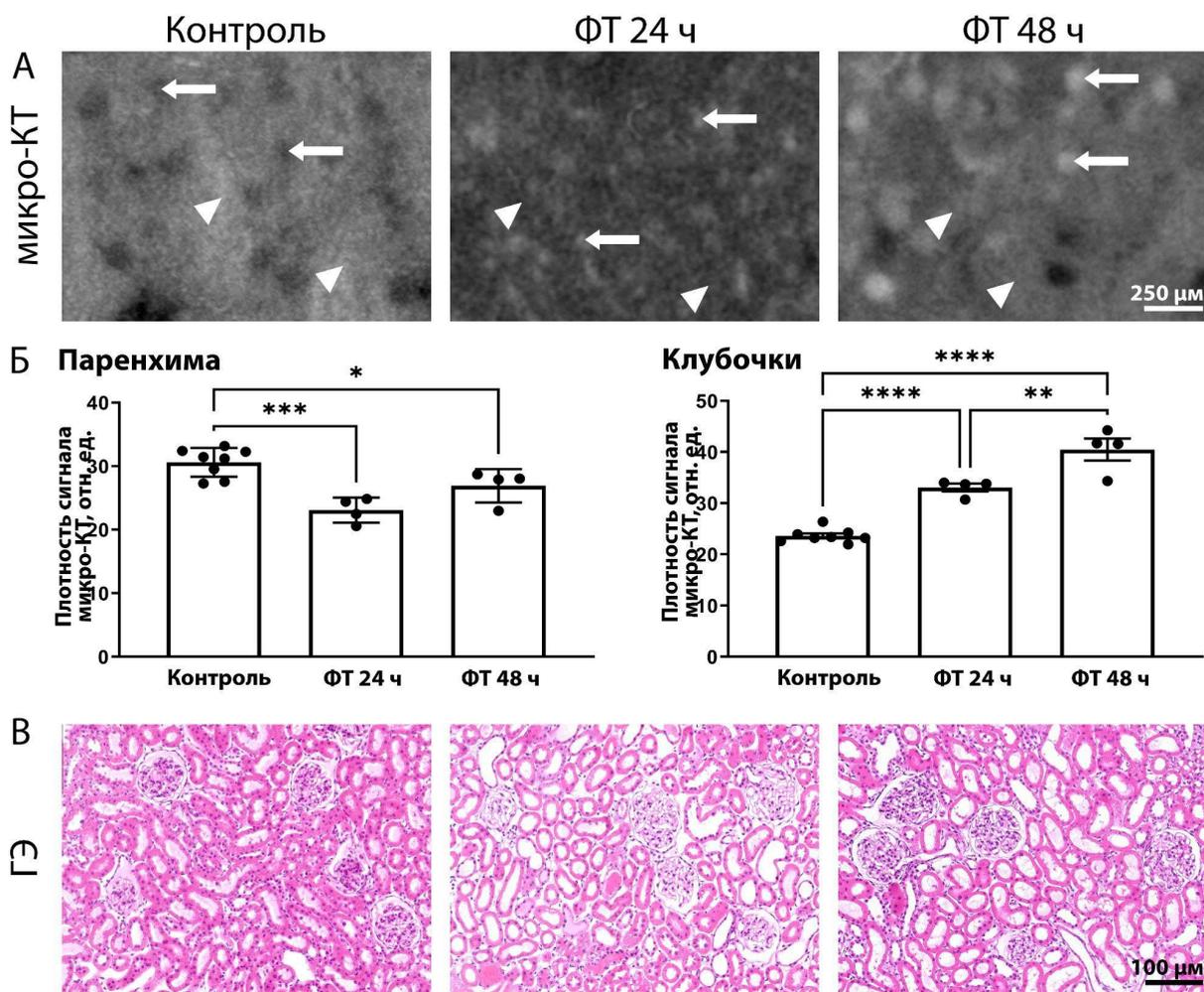
Для визуализации размера и морфологии области инфаркта была проведена оценка жизнеспособности клеток с помощью окрашивания ТТС. Данный метод позволил визуализировать поврежденный очаг как через 24 часа, так и через 48 часов после индукции фототромбоза (Рис. 6А).

Для точного определения размера очага была проведена микро-КТ фиксированных почек как через 24 часа, так и через 48 часов после индукции повреждения (Рис. 6Б,В). Модель фототромбоза почки позволяет получить воспроизводимый очаг со средним объемом  $10,12 \text{ мм}^3 \pm 1,35 \text{ мм}^3$  в почках через 24 ч после фототромбоза и  $12,39 \text{ мм}^3 \pm 0,96 \text{ мм}^3$  в почках через 48 ч после фототромбоза, что составляет примерно 1% объема всей почки (Рис. 6Г).



**Рис. 6.** Оценка жизнеспособности клеток с помощью окрашивания прижизненных срезов почки хлористым ТТС и морфология поврежденного очага. а, Окрашивание почек ТТС через 24 и 48 часов после ФТ. Шкала, 10 мм. б, Микро-КТ целой почки через 24 (n=4) и 48 (n=4) часов после ФТ. Шкала, 2 мм. в, Большое увеличение микро-КТ в зоне очага повреждения через 24 и 48 часов после индукции фототромбоза. Пунктиром показана ишемизированная зона. Шкала, 1 мм. г, Объем повреждения, оцененный микро-КТ, через 24 (n=4) и 48 (n=4) часов после индукции фототромбоза, левый график - объем повреждения в мм<sup>3</sup>, правый - объем очага, нормированный на объем всей почки.

В дополнение к анализу объема, метод микро-КТ был использован для оценки морфологических изменений в области очага фототромбоза, так как при фототромботическом повреждении могут наблюдаться изменения в микроархитектуре тканей. Плотность сигнала микро-КТ ишемизированной паренхимы значительно уменьшалась через 24 ч после повреждения, и возвращалась к исходному уровню через 48 ч после фототромбоза. Клубочки, напротив, показали более высокую интенсивность сигнала, особенно через 48 часов после индукции фототромбоза (Рис. 7). Чтобы интерпретировать эти изменения, те же участки поврежденной ткани были окрашены гематоксилин-эозином (ГЭ). Такое сопоставление результатов микро-КТ и гистологии может быть полезным для получения дополнительной информации об особенностях анатомических структур в области фототромботического поражения. Например, мы обнаружили, что поврежденные клубочки содержали больше эритроцитов, что могло объяснить их более высокий сигнал на изображениях микро-КТ.



**Рис. 7.** Микро-КТ и гистология почки с визуализацией интактной или поврежденной паренхимы и клубочков. **(а)** Микро-КТ поврежденного очага через 24 и 48 часов после ФТ (белыми стрелками обозначены клубочки, треугольниками - канальцы). Шкала, 250 мкм. **(б)** Анализ значений серого в интактной и поврежденной паренхиме или клубочках ( $n$  в контроле = 8,  $n$ (ФТ 24 ч или 48 ч)=4). **(с)** Н&Е окрашивание поврежденного очага через 24 и 48 часов после ФТ. Шкала, 10 мкм. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  (однофакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями Тьюки).

### *4.1.3. Гистологические изменения в области очага фототромбоза*

Чтобы охарактеризовать морфологические изменения в ишемизированном вследствие фототромбоза очаге, были выполнены окрашивания срезов почек различными гистологическими методами. Поражение было хорошо визуализировано с помощью окрашивания гематоксилином-эозином. Очаг фототромбоза имеет менее интенсивную окраску по сравнению с окружающими тканями (Рис. 8а). Внутри области инфаркта были обнаружены сильно поврежденные канальцы и клубочки как через 24, так и через 48 ч после индукции фототромбоза (Рис. 9а). Ишемическое повреждение вызвало потерю ядер и щеточной каемки в некоторых канальцевых клетках (Рис. 9г). Кроме того, клетки внутри поврежденного очага были положительными при окрашивании на расщепленную каспазу-3, маркер апоптотической гибели клеток (Рис. 9б).

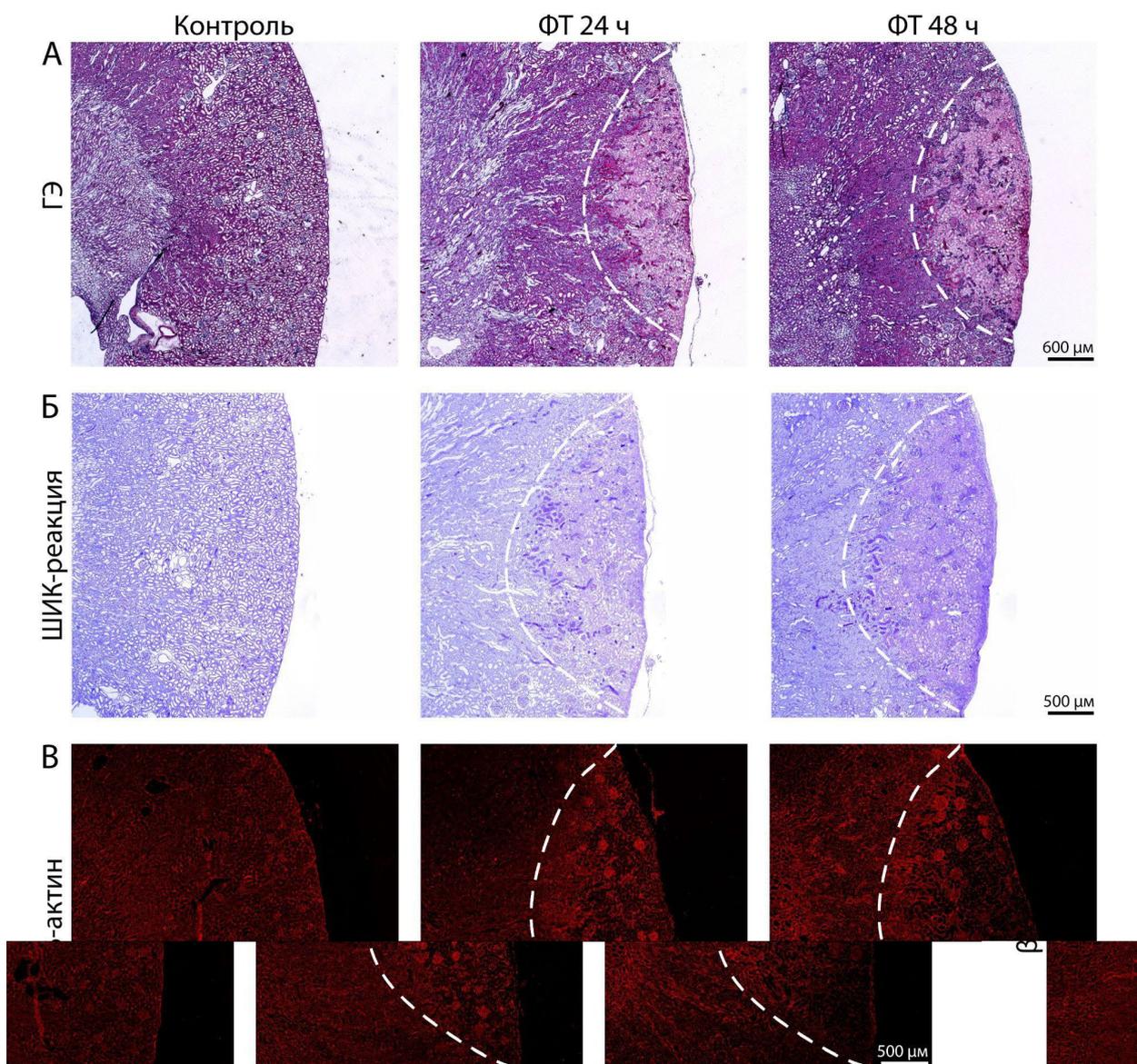
Также было обнаружено, что фототромбоз приводил к накоплению фибрина в сосудах почки, что визуализируется на срезах в виде окрашенной в красный цвет массы с помощью окрашивания MSB, что может быть интерпретировано как вторичный тромбоз (Рис. 9в). Также наблюдалась слабая инфильтрация лейкоцитов в области поражения и прилегающих тканях, что указывает на развитие умеренного воспалительного ответа через 24 ч и 48 ч после фототромбоза (Рис. 9а).

Окрашивание гематоксилином-эозином позволило выявить гиалиновые цилиндры в канальцах в области фототромботического поражения, которые отсутствуют в контроле (Рис. 9а). Стоит отметить, что данные структуры не только визуализировались вокруг поврежденного очага, но также доходили до мозгового вещества и лоханки (Рис. 8а), что указывает на распространение повреждения на весь нефрон. Для лучшей визуализации гиалиновых цилиндров мы проводили ШИК-реакцию. Данная окраска позволяет визуализировать структуры, содержащие углеводы и гликопротеины, включая гиалиновые цилиндры, базальные мембраны и

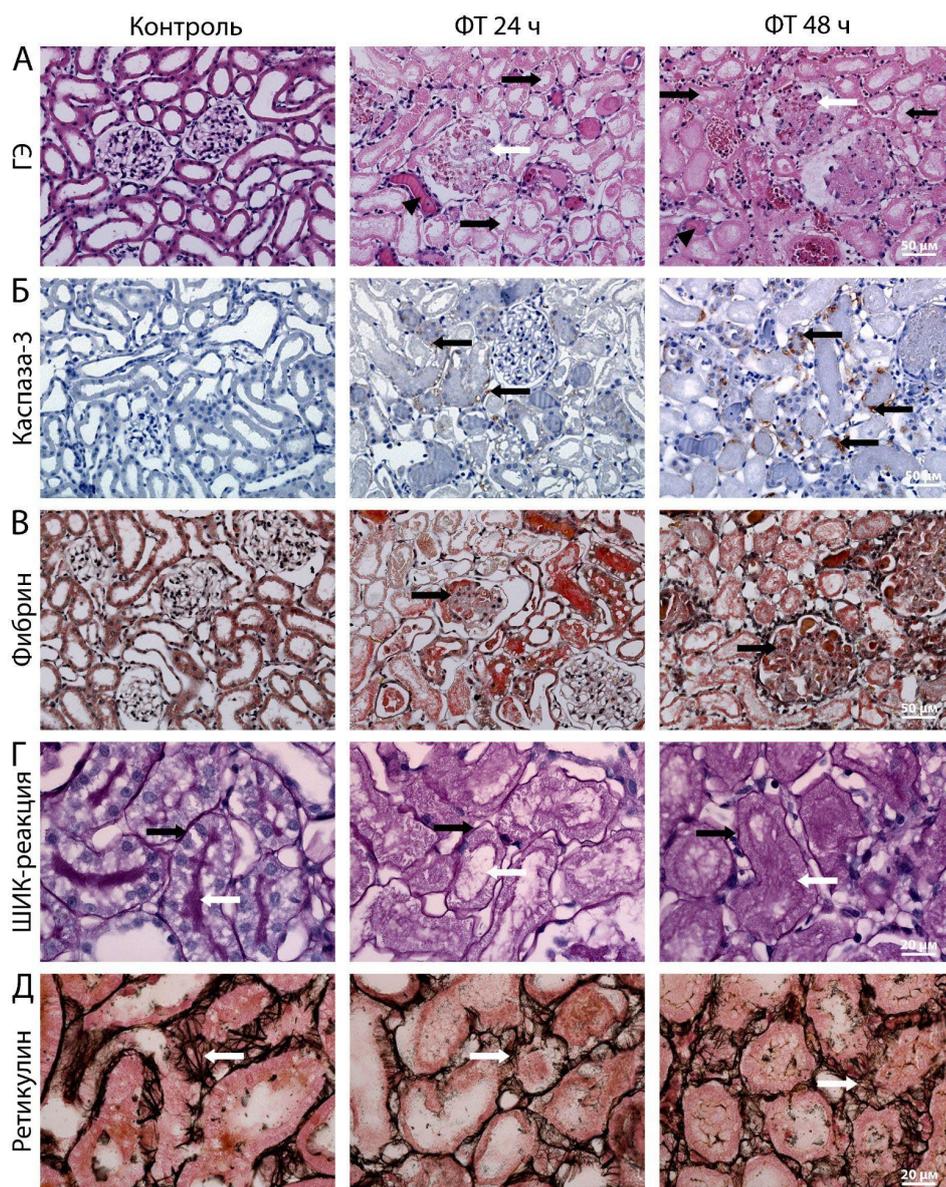
щеточные каемки. Мы обнаружили ШИК-положительные массы, окрашенные в фиолетовый цвет, в канальцах в поврежденной области и прилегающей почечной ткани через 24 и 48 ч после ишемии почек, вызванной фототромбозом (Рис. 8Б).

В очаге фототромбоза наблюдалось разрушение нормальной морфологии щеточных каемок, тем не менее морфологическая структура базальных мембран была сохранена (Рис. 9Г). Потеря щеточных каемок также была подтверждена иммунофлуоресцентным окрашиванием антителами против  $\beta$ -актина (Рис. 8В). Такое окрашивание ясно продемонстрировало разрушение канальцевых клеток, расположенных в поврежденной области, а также нарушенную целостность их щеточной каемки.

Мы также оценили структуру внеклеточного матрикса с помощью окрашивания Гордона-Свита (Рис. 9Д), оценивая состояние коллагена 3-го типа в волокнах ретикулина. В контрольных почках мы обнаружили толстые ретикулиновые волокна, окрашенные в черный цвет. После повреждения почек, вызванного фототромбозом, наблюдалась небольшая дезорганизация, разрушение и истончение волокон ретикулина (Рис. 9Д).



**Рис. 8.** Морфологические изменения в зоне повреждения, развившегося в результате фототромбоза сосудов почки, и вокруг очага. А, Окрашивание почек гематоксилином-эозином в контроле и через 1 и 2 суток после индукции ФТ. Шкала, 600  $\mu\text{m}$ . Б, ШИК-реакция intactных и поврежденных почек (через 1 и 2 суток после индукции ФТ). Шкала, 500  $\mu\text{m}$ . В, Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против  $\beta$ -актина intactных и поврежденных почек (через 1 и 2 суток после индукции ФТ). Шкала, 500  $\mu\text{m}$ . Пунктиром показана ишемизированная зона.

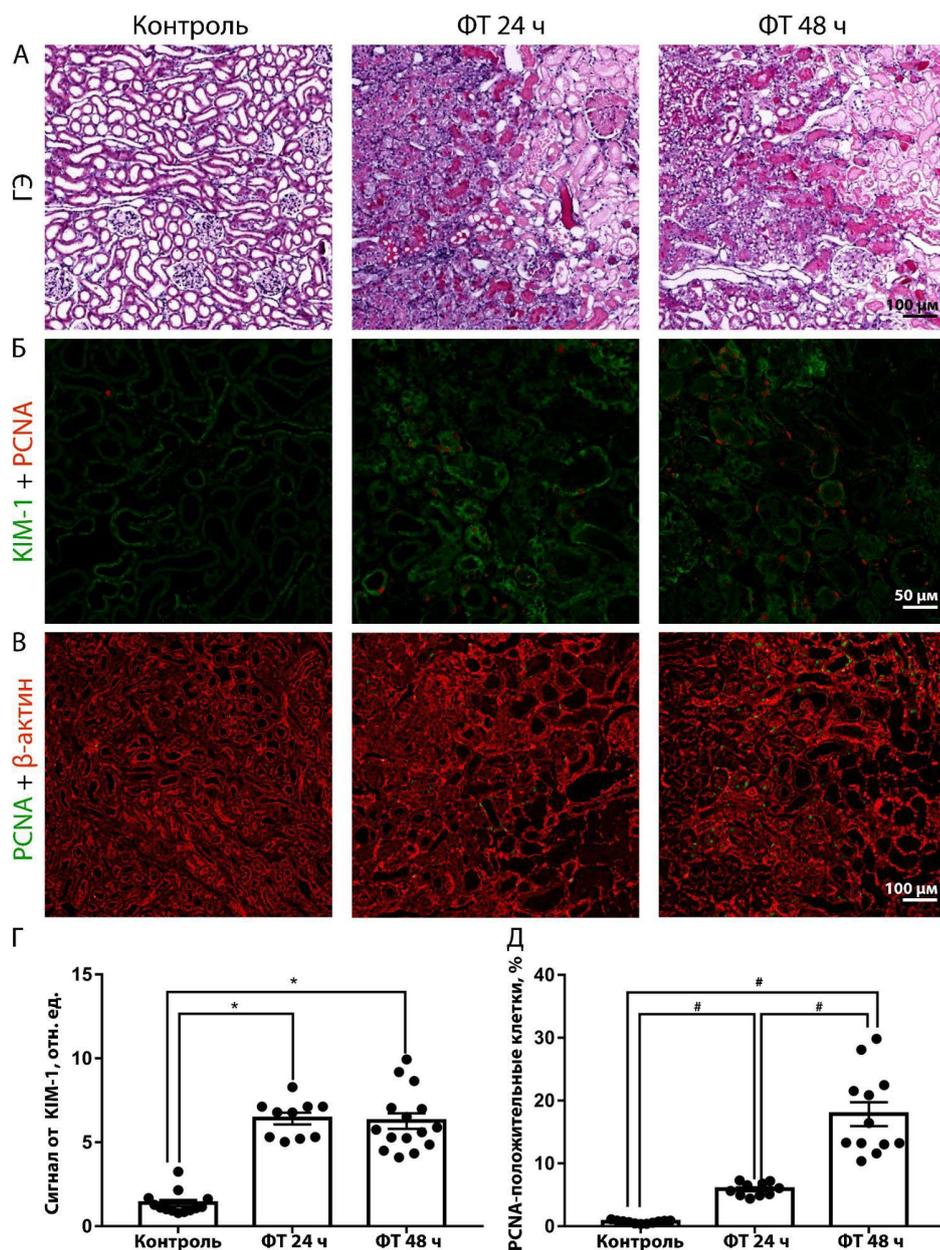


**Рис. 9.** Морфологические изменения в зоне очага фототробоза и в прилегающих областях. А, Окрашивание срезов почек гематоксилином-эозином (разрушенные клубочки (белые стрелочки) канальцы, потерявшие ядра и щеточную каемку (черные стрелочки), некоторые с гиалиновыми цилиндрами (черные треугольники). Шкала, 50  $\mu$ м. Б, Иммунохимическое окрашивание на активированную каспазу-3 для визуализации апоптотических клеток (визуализируется как коричневатые массы, показанные черными стрелками). Шкала, 50  $\mu$ м. В, MSB окрашивание для обнаружения краснокрашенного фибрина внутри сосудов (черные стрелки). Шкала, 50  $\mu$ м. Г, ШИК-реакция, визуализирующая базальные мембраны (черные стрелки) и щеточную каемку (белые стрелочки). Шкала, 20  $\mu$ м. Д, Окрашивание Gordon-Sweets для обнаружения ретикулиновых волокон (белые стрелки). Шкала, 20  $\mu$ м.

#### ***4.1.4. Фототромбоз приводил к повышению уровня маркеров повреждения и пролиферации.***

Маркеры повреждения и пролиферации оценивали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания (Рис. 10). В интактной ткани почки маркер повреждения почек (KIM-1) обычно не обнаруживается, тогда как его экспрессия быстро возрастает в течение нескольких часов после повреждения почки. Действительно, уровни KIM-1 были выше в поврежденном очаге и окружающих тканях через 24 и 48 ч после повреждения по сравнению с интактной почкой (Рис. 10Г).

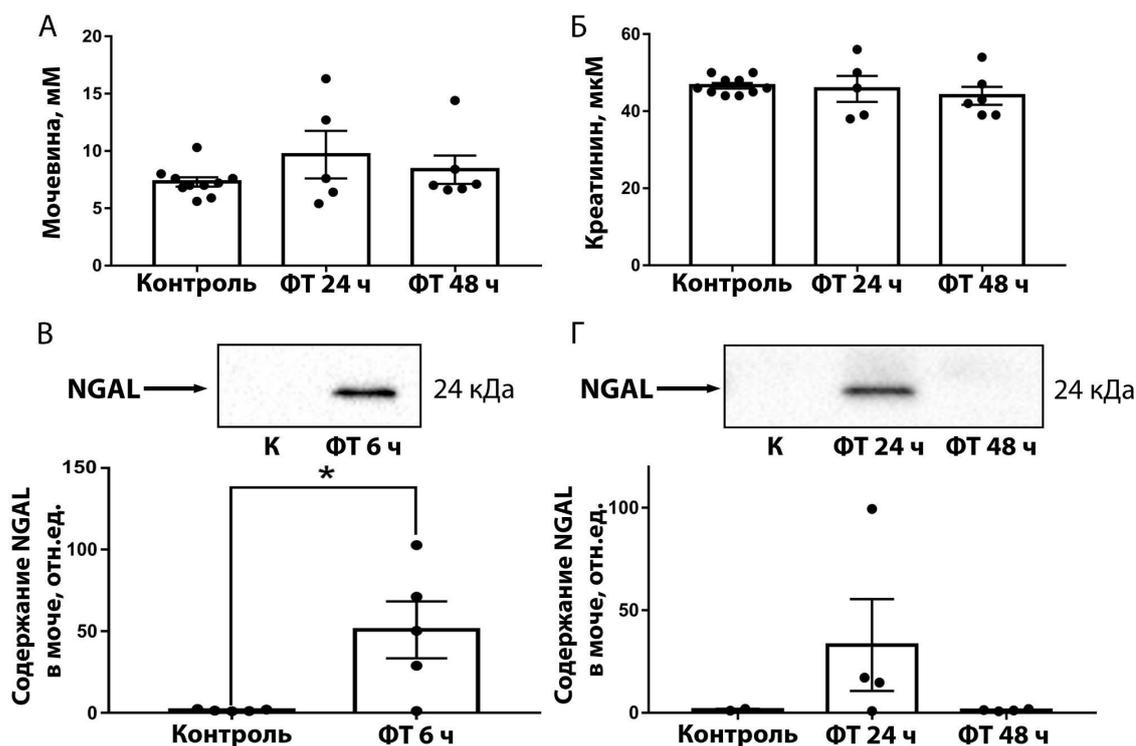
Срезы почек также окрашивали антителами против ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA), уровень которого отражает индукцию пролиферации и регенерацию тканей. Мы обнаружили, что экспрессия PCNA была в основном локализована совместно с KIM-1-положительными канальцами (Рис. 10А). Двойное окрашивание антителами против  $\beta$ -актина и PCNA (Рис. 10Б) показало, что PCNA-положительные клетки в основном обнаруживались в канальцах в , расположенных на границе поврежденной и здоровой ткани. Максимальное увеличение количества PCNA<sup>+</sup> клеток наблюдали через 2 суток после ФТ (Рис. 10Д). Стоит отметить, что наблюдалась колокализация при окрашивании на PCNA и DAPI, что доказывает специфичное для ядер окрашивание против PCNA. С помощью количественного анализа изображений, мы оценили количество PCNA-позитивных клеток и нормализовали его к общему количеству клеток на изображении, измеренному с помощью окрашивания DAPI. Выявлено значительное увеличение количества PCNA-позитивных клеток через 24 ч (5,9 %  $\pm$  0,32 %) и 48 ч (17,9 %  $\pm$  1,90 %) после повреждения, вызванного фототромбозом, по сравнению с контрольной группой (0,7 %  $\pm$  0,07 %).



**Рис. 10.** Динамика экспрессии маркера повреждения и пролиферации в зоне очага фототромбоза и на границе поврежденной и здоровой ткани. А, ГЭ. Б, Иммунофлуоресцентное окрашивание на маркер почечного повреждения (KIM-1, зеленый) и маркер пролиферации (PCNA, красный). Шкала, 50 мкм. В, Иммунофлуоресцентное окрашивание на маркер цитоскелета (β-актин, красный) и маркер пролиферации (PCNA, зеленый). Шкала, 100 мкм. Г, Количественная оценка экспрессии KIM-1 на срезах. Д, Количество PCNA<sup>+</sup> ядер, нормализованное на общее количество клеток, оцененное по DAPI. Все окрашивания проводились в контроле (n=10 полей зрения) или через 1 (n=10) и 2 суток после ФТ (n=15). \*p < 0.05 (однофакторный дисперсионный анализ с использованием теста множественных сравнений Тьюки), #p < 0.05 (тест Краскела-Уоллиса с использованием теста множественных сравнений Данна)

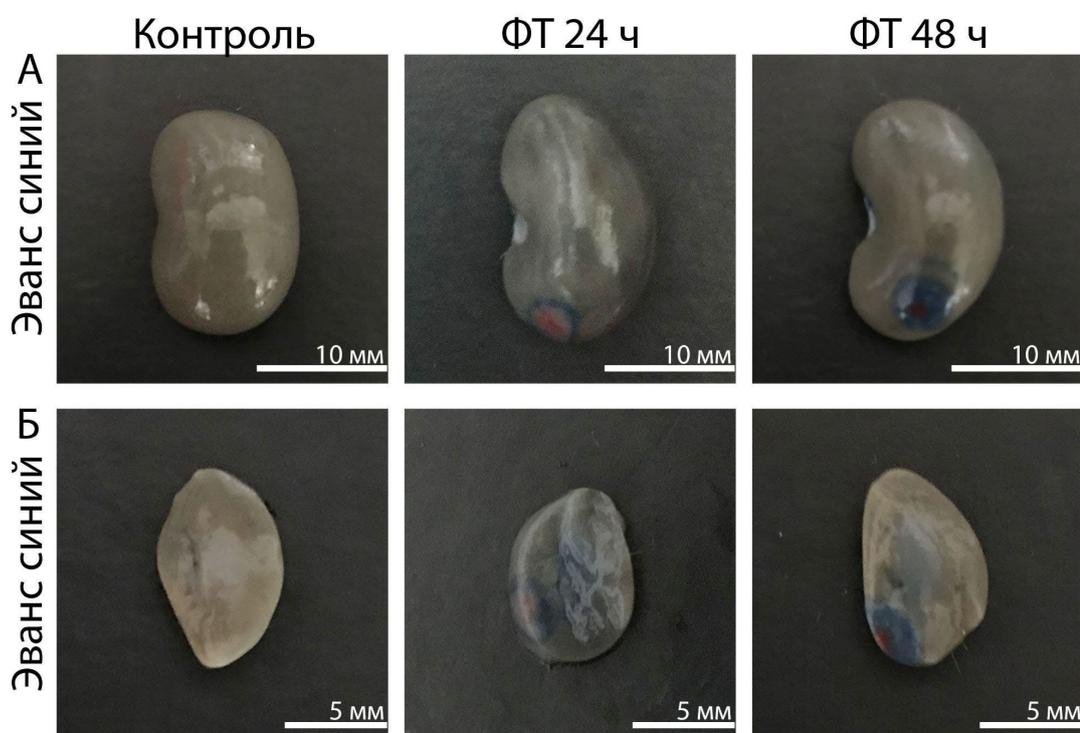
#### 4.1.5. Фототромбоз вызвал почечную дисфункцию

Мы оценивали нарушение функции почек путем измерения концентраций мочевины (BUN) и SCr в сыворотке, которые являются общепринятыми маркерами ОПП в клинической практике. Индуцированное тромбозом повреждение не вызывало значительного повышения уровней BUN и SCr (Рис. 11А,Б). Помимо классических маркеров, для оценки развития ОПП использовали NGAL, поскольку этот маркер более чувствителен к повреждению, чем BUN и SCr. Мы обнаружили значительное увеличение уровня uNGAL через 6 часов после ФТ (Рис. 11В). Через сутки после фототромбоза уровень NGAL уже начинал снижаться, тогда как 2 суток после индукции повреждения NGAL снижался до контрольного уровня (Рис. 11Г).



**Рис. 11.** Оценка маркеров почечной дисфункции и повреждения. А, Концентрация мочевины в контроле ( $n=10$ ) через 1 ( $n=6$ ) и 2 ( $n=6$ ) суток после индукции ФТ. Б, Концентрация креатинина через 1 и 2 суток после индукции ФТ. В, Уровень NGAL в моче через 6 часов после ФТ ( $n(\text{контроль}) = 5$ ,  $n(\text{ФТ}) = 5$ ), измеренный с помощью вестерн-блоттинга. Г, Уровень NGAL в моче через 1 ( $n=4$ ) и 2 ( $n=4$ ) суток после индукции ФТ, измеренный с помощью вестерн-блоттинга. \* $p < 0.05$  (непарный  $t$ -test).

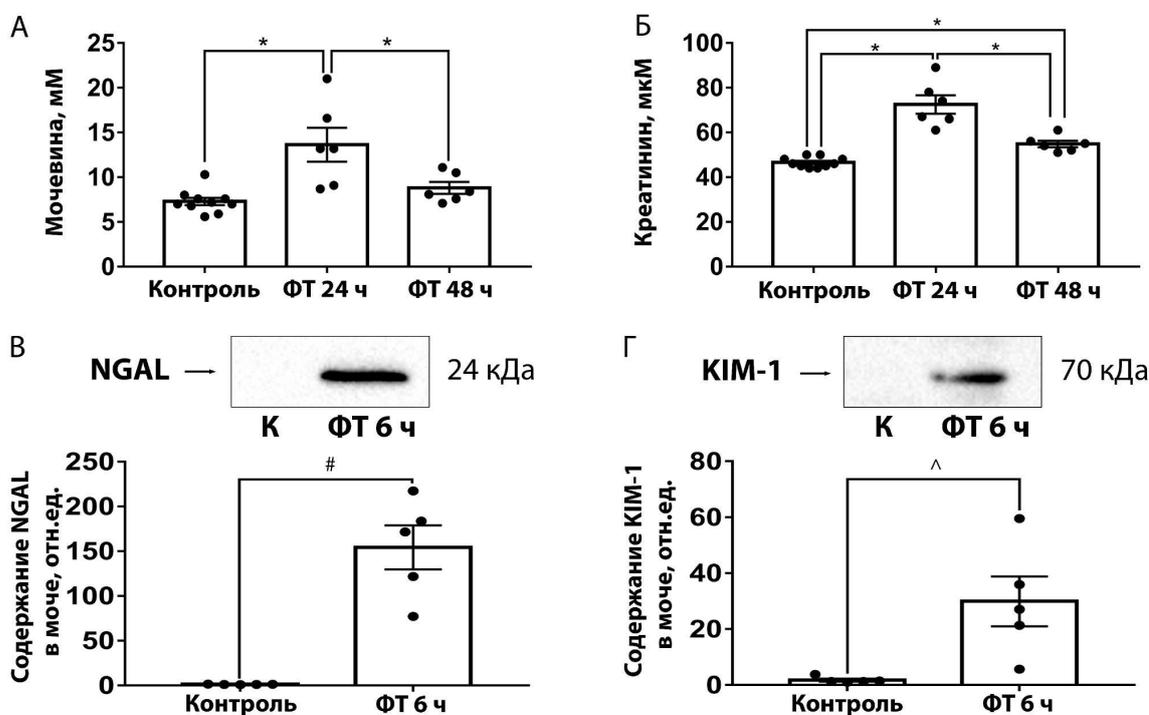
Кроме того, для стандартной модели мы косвенно оценили повреждение почек с помощью теста на проницаемость сосудов с использованием красителя Эванса синего. Эванс Синий связывается с сывороточным альбумином и обычно остается в кровотоке. Если стенка сосуда повреждена, можно наблюдать выход данного красителя из кровотока с окрашиванием окружающих тканей. После фототромбоза мы обнаружили распространение Эванса Синего в ткани вблизи очага как через 24 ч, так и через 48 ч после повреждения, что указывает на наличие повреждения сосудистой стенки в течение как минимум 2 дней (Рис. 12).



*Рис. 12. Оценка проницаемости сосудов после ФТ-индуцированной ишемии почки. А, Вид целой почки. Б, срез почки.*

В дополнение к этому, мы использовали модель с увеличенным размером поражения, чтобы получить более серьезное повреждение и продемонстрировать возможность выявлять нарушение функции почек с использованием классических маркеров. Для этого мы использовали источник света с большим диаметром луча (6 мм), и размер фототромботического повреждения в этой модифицированной модели был

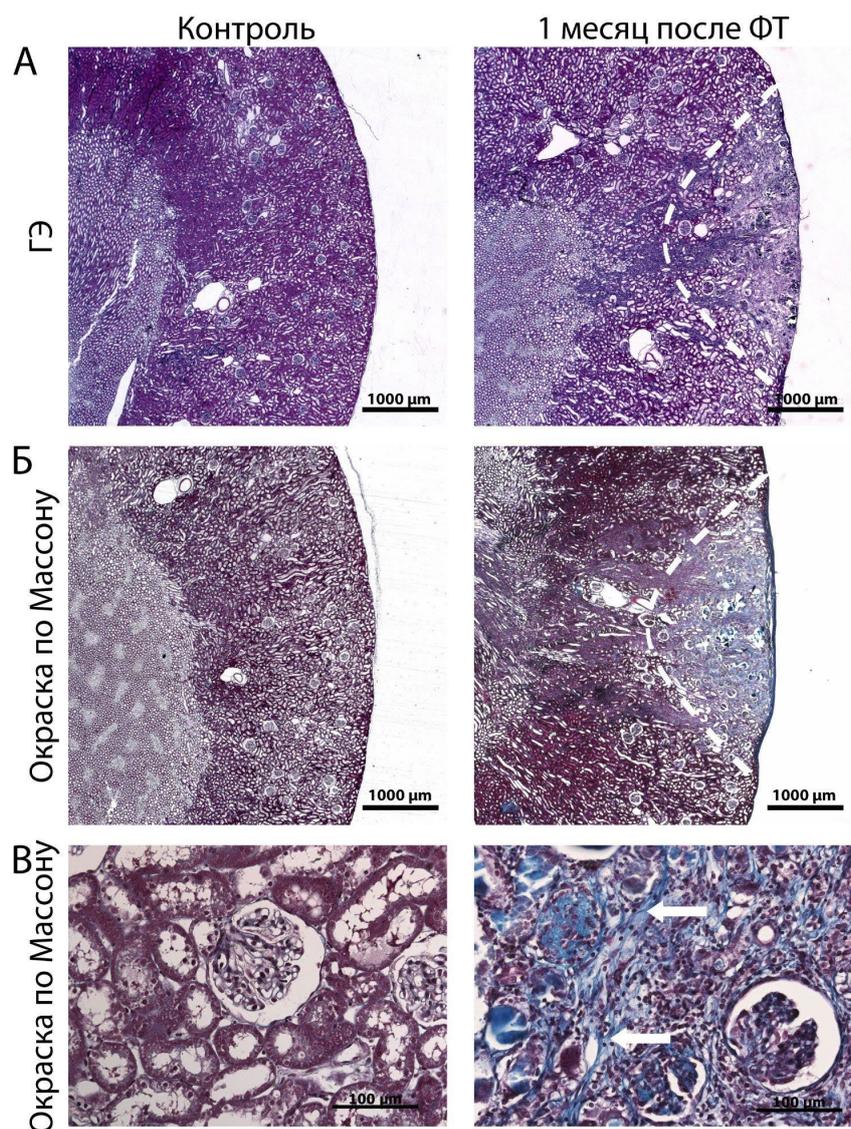
больше по сравнению с нашей стандартной моделью (Рис. 5). Помимо увеличенного размера повреждения, мы провели контралатеральную нефрэктомия, чтобы достичь более выраженного увеличения маркеров ОПП в крови и моче. В модифицированной модели мы обнаружили значительное повышение концентрации BUN через 24 часа после фототромбоза, которое снизилось до контрольных уровней через 48 часов после повреждения (Рис. 13А). Концентрация SCr в этой модели была значительно выше как через 24 часа, так и через 48 часов (Рис. 13Б). Также было обнаружено повышение маркеров ОПП NGAL и KIM-1 в моче через 6 часов после фототромбоза (Рис. 13В,Г).



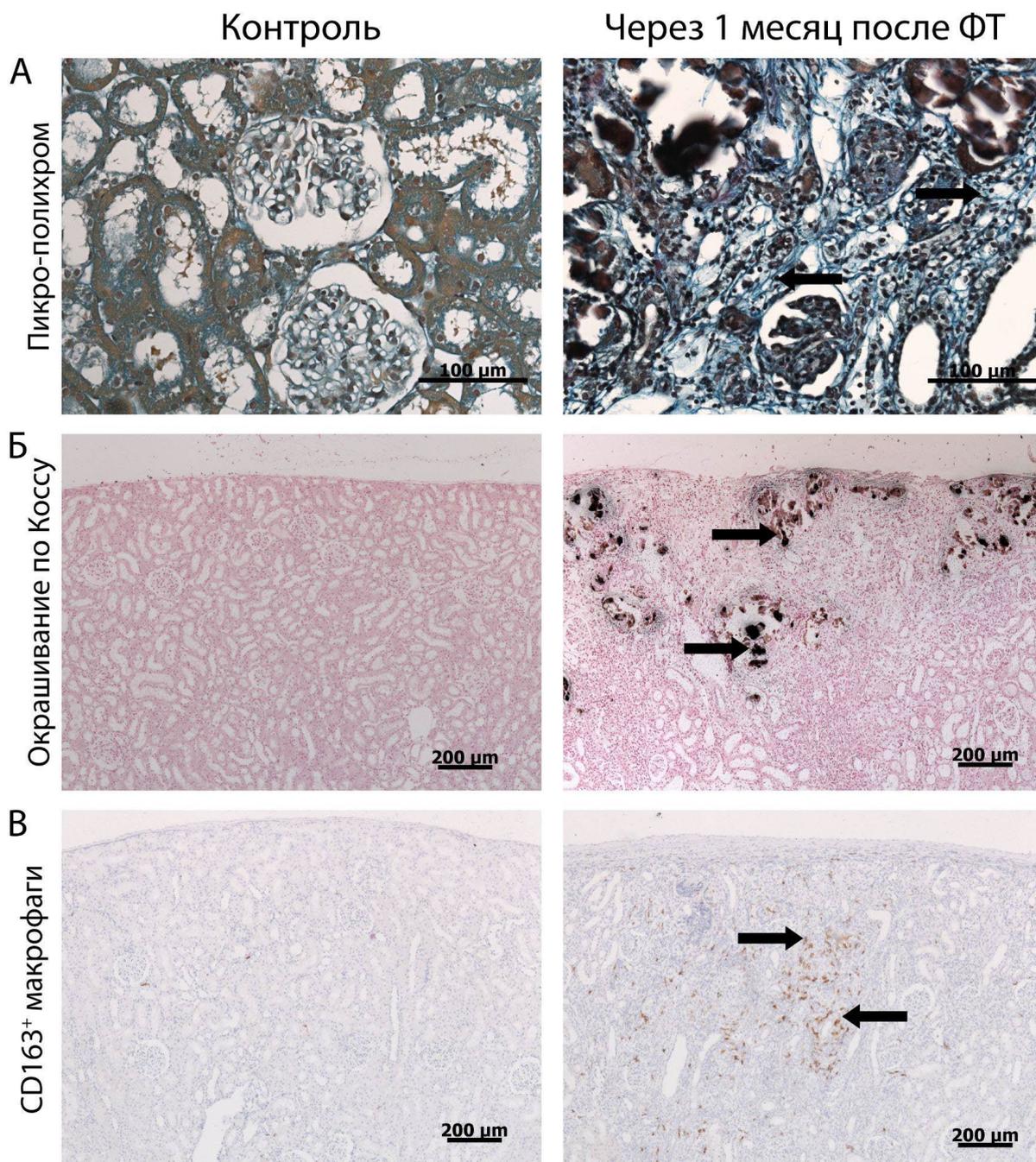
**Рис. 13.** Оценка маркеров почечной дисфункции и почечного повреждения в модифицированной модели фототромбоза. А, Концентрация мочевины в контроле ( $n=10$ ) через 1 ( $n=6$ ) и 2 ( $n=6$ ) суток после индукции фототромбоза. Б, Концентрация креатинина через 1 и 2 суток после индукции фототромбоза. В, Уровень NGAL или Г, KIM-1 в моче через 6 часов после индукции фототромбоза, измеренный денситометрией на основе результатов вестерн-блоттинга ( $n(\text{контроль}) = 5$ ,  $n(\text{ФТ}) = 5$ ).  $*p < 0.05$  (однофакторный дисперсионный анализ с использованием теста множественных сравнений Тьюки),  $\#p < 0.05$  (Критерий Манна-Уитни),  $\wedge p < 0.05$  (непарный  $t$ -test)

#### **4.1.6. Фототромбоз вызвал фиброз почек**

Мы исследовали не только острые последствия ишемии почек, вызванной фототромбозом, но и отдаленные последствия, такие как фиброз. Окрашивание гематоксилином-эозином четко продемонстрировало, что поврежденный очаг сохраняется через 1 месяц после фототромбоза (Рис. 14А). Мы выявили развитие фиброза в почке, а именно незрелые коллагеновые волокна в области очага повреждения, окрашенные в синий цвет трихромом Массона (Рис. 14Б,В) и пикро-полихромом (Рис. 15А). Мы также выявили значительную кальцификацию в очаге поражения с помощью специфического окрашивания по Коссу на отложения кальция, что также является признаком фиброза почки (Рис. 15Б). В качестве дополнительного маркера фиброза и воспаления в почечной ткани мы оценили содержание CD163<sup>+</sup> макрофагов, которые обладают фенотипом M2. Мы наблюдали присутствие CD163<sup>+</sup> макрофагов как в области фототромбоза, так и в окружающих тканях через 1 месяц после фототромбоза почек (Рис. 15В).

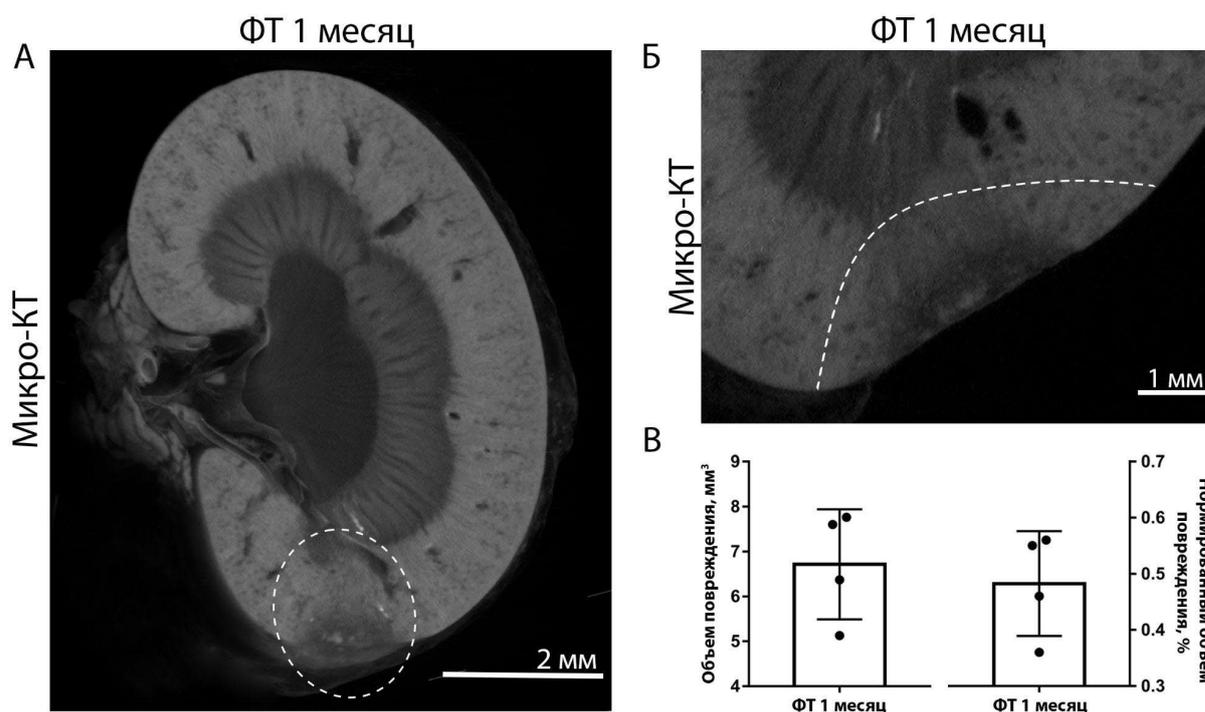


**Рис. 14.** Долгосрочные последствия фотоиндуцированной ишемии почки. А, Окрашивание срезов почек гематоксилином-эозином в контроле и через месяц после индукции фототромбоза. Пунктиром показана ишемизированная зона. Шкала, 1000 μm. Б, Окрашивание трихром по Массону в контроле и через месяц после индукции фототромбоза. Пунктиром показана ишемизированная зона. Шкала, 1000 μm. В, Окрашивание трихром по Массону в контроле и через месяц после индукции фототромбоза (белой стрелкой показаны коллагеновые волокна). Шкала, 100 μm.



**Рис. 15.** Долгосрочные последствия фотоиндуцированной ишемии почки. *А*, Окрашивание срезов почек пикро-полихромом в контроле и через месяц после индукции фототромбоза. Пунктиром показан очаг ФТ. *Б*, Окрашивание по Коссу в контроле и через месяц после индукции фототромбоза. Шкала, 200  $\mu\text{m}$ . *В*, Иммуногистохимическое окрашивание антителами против CD163<sup>+</sup> в контроле и через месяц после индукции фототромбоза (черными стрелками показаны CD163<sup>+</sup> макрофаги). Шкала, 100  $\mu\text{m}$ .

Для оценки повреждения в отдаленный период мы также провели анализ объема очага с использованием микро-КТ через 1 месяц после фототромботического повреждения и показали, что к этому времени размер поражения уменьшился (Рис. 16), вероятно, из-за уменьшения отека и регенерации тканей. Структура почечной ткани внутри поражения также изменилась, в частности, стало крайне сложно четко идентифицировать клубочки.



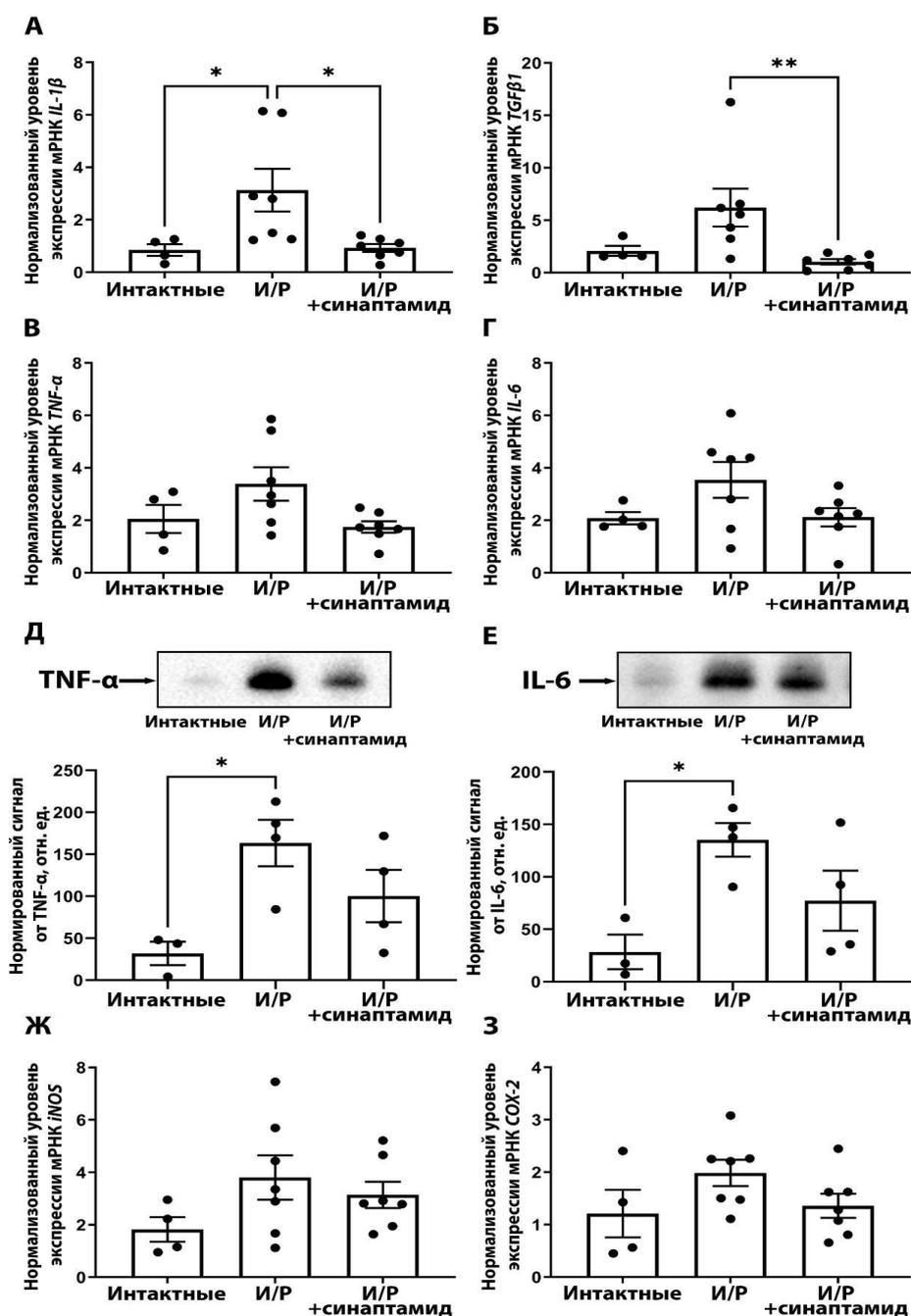
**Рис. 16.** Морфология и анализ объема очага повреждения через 1 месяц после фототромбоза. (А) Микро-КТ целой почки. Шкала, 2 мм. (Б) Большое увеличение микро-КТ в зоне очага повреждения через 1 и 2 суток после индукции фототромбоза. Пунктиром показана ишемизированная зона. Шкала, 1 мм. (В) Объем очага повреждения (абсолютное значение и нормализованное на объем почки,  $n=4$ ).

## **4.2. Исследование влияния синаптамида на развитие почечного повреждения вследствие ишемии/реперфузии**

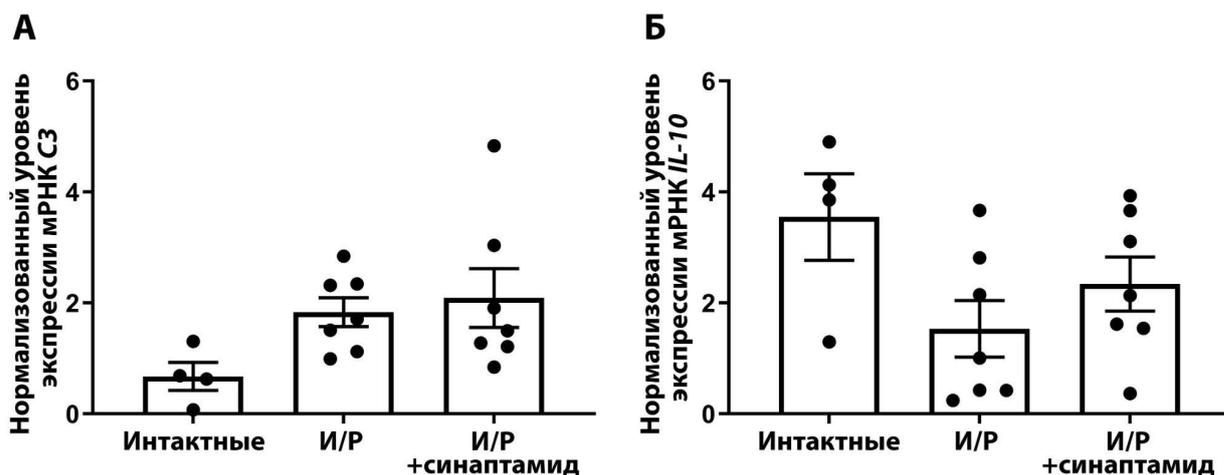
Известно, что одним из важных последствий ОПП является воспаление. Для изучения роли воспаления, а также для поиска возможных терапевтических агентов проводилось моделирование И/Р почки, сопряженное с терапией структурным аналогом анандамида синаптамидом (производным омега-3 жирной кислоты). В случае ишемии мозга данное вещество оказывает выраженный синаптогенный, нейрогенный и противовоспалительный эффекты.

### **4.2.1. Синаптамид снижал воспаление в почечной ткани после ишемического повреждения**

В рамках данной работы мы исследовали влияние терапии синаптамидом при И/Р-индуцированном ОПП на медиаторы воспаления. Мы показали, что уровни некоторых цитокинов были повышены в ткани почки через 48 ч после И/Р почки, а именно интерлейкин (IL) 1 бета (IL-1 $\beta$ ), фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и IL-6 (Рис. 17А,В,Г). Введение синаптамида значительно снижало экспрессию IL-1 $\beta$  и трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) (Рис. 17Б) и имело тенденцию к снижению уровней TNF- $\alpha$  и IL-6 через 48 ч после И/Р почки (Рис. 17). Кроме того, мы наблюдали тенденцию к увеличению экспрессии мРНК индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) (Рис. 17Ж), циклооксигеназы-2 (COX-2) (Рис. 17З) и компонента комплемента 3 (C3) (Рис. 18А) в почках через 2 суток после ишемии, в то время как лечение синаптамидом снижало экспрессию COX-2 (Рис. 17З). Кроме того, мы оценили экспрессию IL-10, который является противовоспалительным цитокином. Экспрессия IL-10 в почечной ткани падала после И/Р, но в меньшей степени у крыс, которые получали терапию синаптамидом (Рис. 18Б).



**Рис. 17.** Уровни провоспалительных медиаторов после И/Р и лечения синаптамидом. (А) Экспрессия мРНК IL-1 $\beta$ . (Б) Экспрессия мРНК TGF $\beta$ 1. (В) Экспрессия мРНК TNF- $\alpha$ . (Г) Экспрессия мРНК IL-6. (Д) Нормализованный уровень TNF- $\alpha$ , измеренный с помощью вестерн-блоттинга. (Е) Нормализованный уровень IL-6, измеренный с помощью вестерн-блоттинга ( $n$ (интактные)=3,  $n$ (И/Р)=4,  $n$ (И/Р+синаптамид)=4). (Ж) Экспрессия мРНК iNOS. (З) Экспрессия мРНК COX-2. ( $n$ (интактные)=4,  $n$ (И/Р)=6,  $n$ (И/Р+синаптамид)=6) \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (однофакторный дисперсионный анализ с использованием теста множественных сравнений Тьюки или теста Краскела-Уоллиса с использованием теста множественных сравнений Данна).

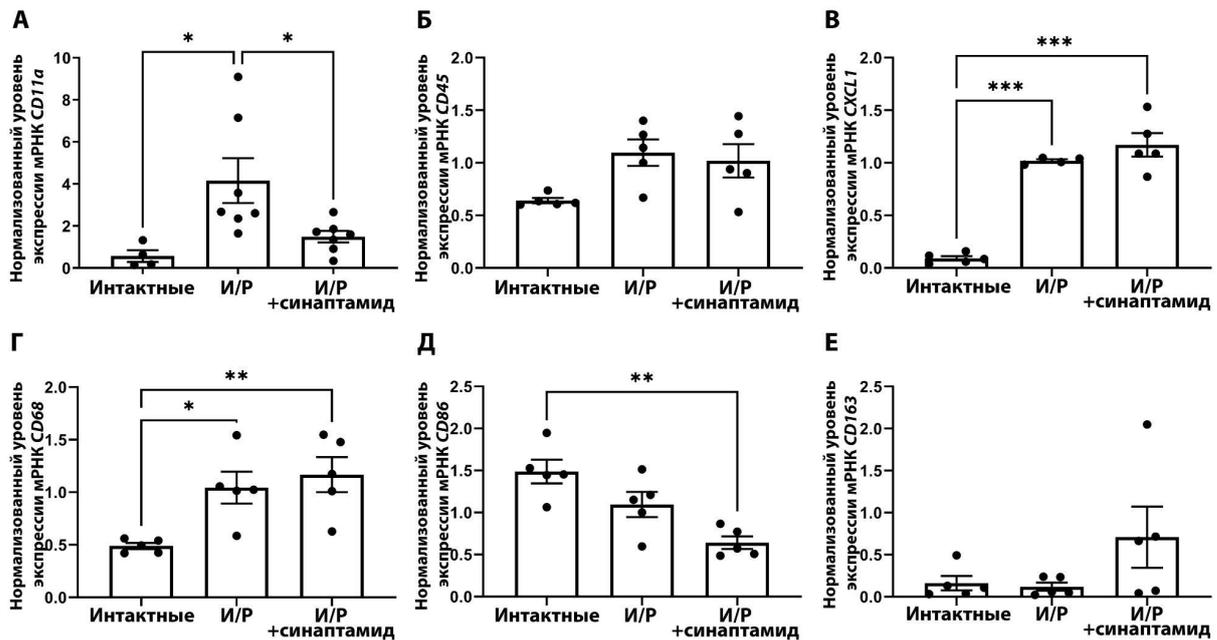


*Рис. 18. Экспрессия воспалительных медиаторов после И/Р и лечения синаптамидом. (А) Экспрессия мРНК С3. (Б) Экспрессия мРНК IL-10.*

#### **4.2.2. Эффекты синаптамиды на инфильтрацию лейкоцитов в ткань почки после ишемии**

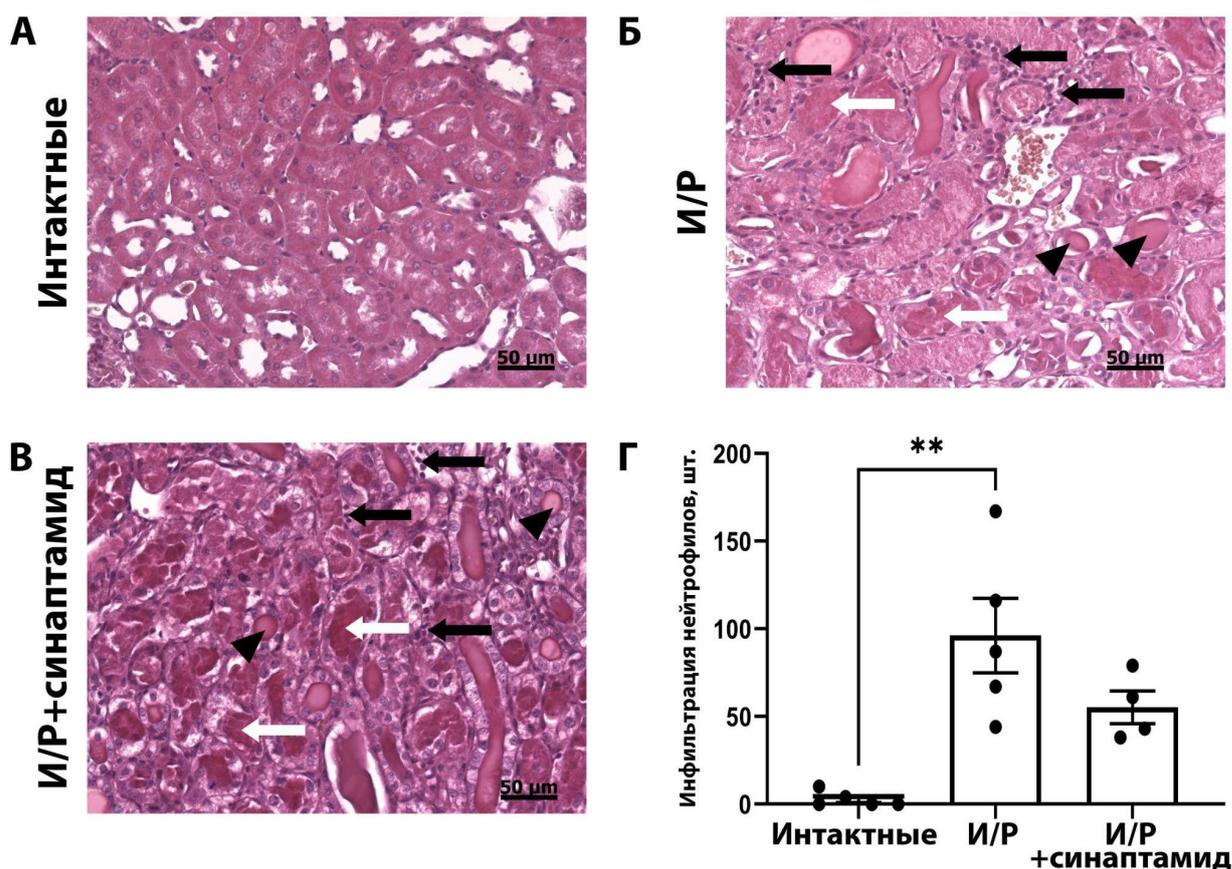
Также мы исследовали представленность популяций лейкоцитов в ткани почки после ишемически-реперфузионного повреждения и влияние синаптамиды на их численность (Рис. 19). Сначала мы исследовали экспрессию кластера дифференцировки (CD) 11а (CD11а), интегрина, который регулирует клеточную адгезию и присутствует на всех лейкоцитах [Naeim, Nagesh Rao, Grody, 2008]. Мы продемонстрировали, что экспрессия мРНК CD11а в почках значительно увеличилась после И/Р почки, тогда как введение синаптамиды снижало экспрессию (Рис. 19А). Другой панлейкоцитарный маркер, CD45, имел тенденцию к увеличению после И/Р почки как в группах, не получавших лечения, так и в группах, получавших синаптамид (Рис. 19Б). Кроме того, мы исследовали экспрессию хемокинового маркера нейтрофилов (мотив С-Х-С) лиганда 1 (CXCL1) и наблюдали статистически значимое увеличение как в группах “I/R”, так и в группах “I/R+синаптамид” (Рис. 19В). Мы также оценили экспрессию специфического макрофагального маркера CD68, которая увеличилась после И/Р почки (Рис. 19Г). Хотя синаптамид не изменял общее количество макрофагов, терапия уменьшала количество CD86<sup>+</sup> клеток (Рис. 19Д), которые предположительно являются макрофагами M1, и

увеличивала количество CD163<sup>+</sup> клеток, которые являются макрофагами M2 (Рис. 19Е).



**Рис. 19.** Представленность различных популяций лейкоцитов в ткани почки после И/Р почек и лечения синаптамидом. (А) Экспрессия мРНК CD11a. (Б) Экспрессия мРНК CD45. (В) Экспрессия мРНК CXCL1. (Г) Экспрессия мРНК CD68. (Д) Экспрессия мРНК CD86. (Е) Экспрессия мРНК CD163. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (однофакторный ANOVA с множественным сравнением по Тьюки).

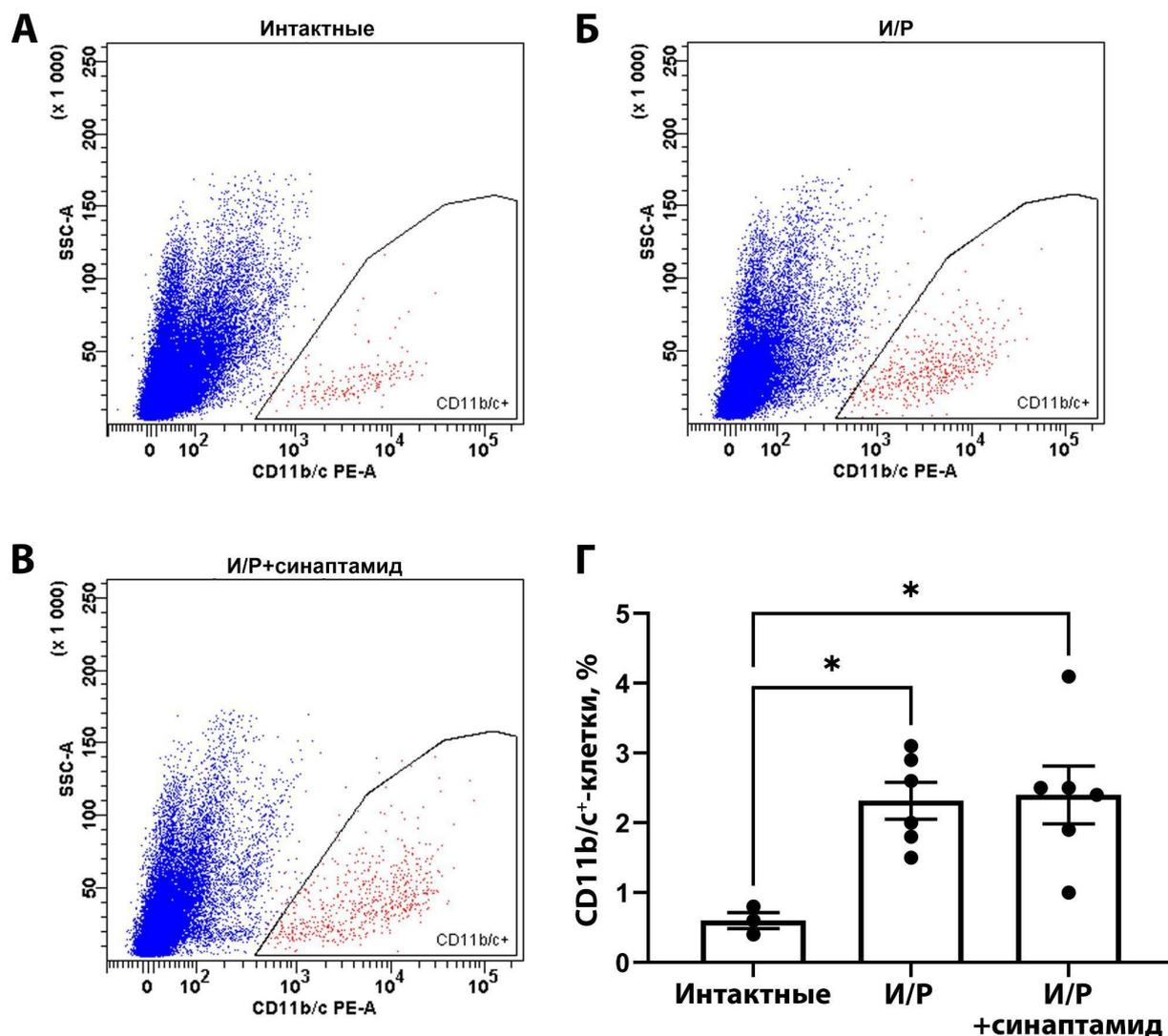
Поскольку нейтрофилы являются основными иммунными клетками, инфильтрирующими в почечную ткань в результате И/Р, мы оценили количество нейтрофилов гистологическими методами (Рис. 20А,Б,В). Мы продемонстрировали, что И/Р приводила к значительному увеличению количества нейтрофилов в почках, которое было частично уменьшено введением синаптамида при И/Р (Рис. 20Г). Также следует отметить, что мы выявили гиалиновые цилиндры в канальцах, десквамацию эпителиальных клеток и клетки митотической фазы в канальцах в обеих экспериментальных группах.



**Рис. 20.** Инфильтрация нейтрофилов в ткань почки после повреждения почки и лечения синаптамидом. Окрашивание срезов почек гематоксилин-эозином (H&E) интактных крыс (А), через 2 суток после ишемии/реперфузии. (Б) или через 48 часов после ишемии/реперфузии с лечением синаптамидом. (В). Нейтрофилы (черные стрелки), гиалиновые цилиндры (черные стрелки-указатели) и десквамация эпителиальных клеток (белые стрелки) наблюдаются в почечной ткани после И/Р. (Г) Оценка количества нейтрофилов в почечной ткани интактных крыс (n=5), через 48 часов после ишемии/реперфузии (n=5) или через 48 часов после ишемии/реперфузии с лечением синаптамидом (n=4). \*\*  $p < 0,01$  (тест Краскела–Уоллиса с множественными сравнениями по Данну). Каждая точка представляет среднее значение количества нейтрофилов, подсчитанных в 10 полях зрения площадью 1,45 мм<sup>2</sup>.

Мы также оценили лейкоцитарную инфильтрацию с помощью проточной цитометрии клеток почек, окрашенных антителами против

CD11b/c (Рис. 21, а-с), которая в основном выявляет нейтрофилы и макрофаги. Мы продемонстрировали, как сама по себе ишемия с последующей реперфузией, так и сопряженная с терапией синаптамидом приводила к значительному увеличению количества CD11b/c- положительных (CD11b/c<sup>+</sup>) клеток по сравнению с интактными животными (Рис. 21d).



**Рис. 21.** Инфильтрация CD11b/c<sup>+</sup> клеток в ткань почки. Проточная цитометрия клеток, полученных из почек интактных крыс (n=3) (А), через 2 суток после повреждения (n=5) (Б) или после повреждения на фоне с лечения синаптамидом (n=5) (В), окрашенных антителами против CD11b/c<sup>+</sup>. (Г) Содержание CD11b/c<sup>+</sup> клеток в почках всех экспериментальных групп. \* p < 0,05 (однофакторный дисперсионный анализ с множественным сравнением Тьюки).

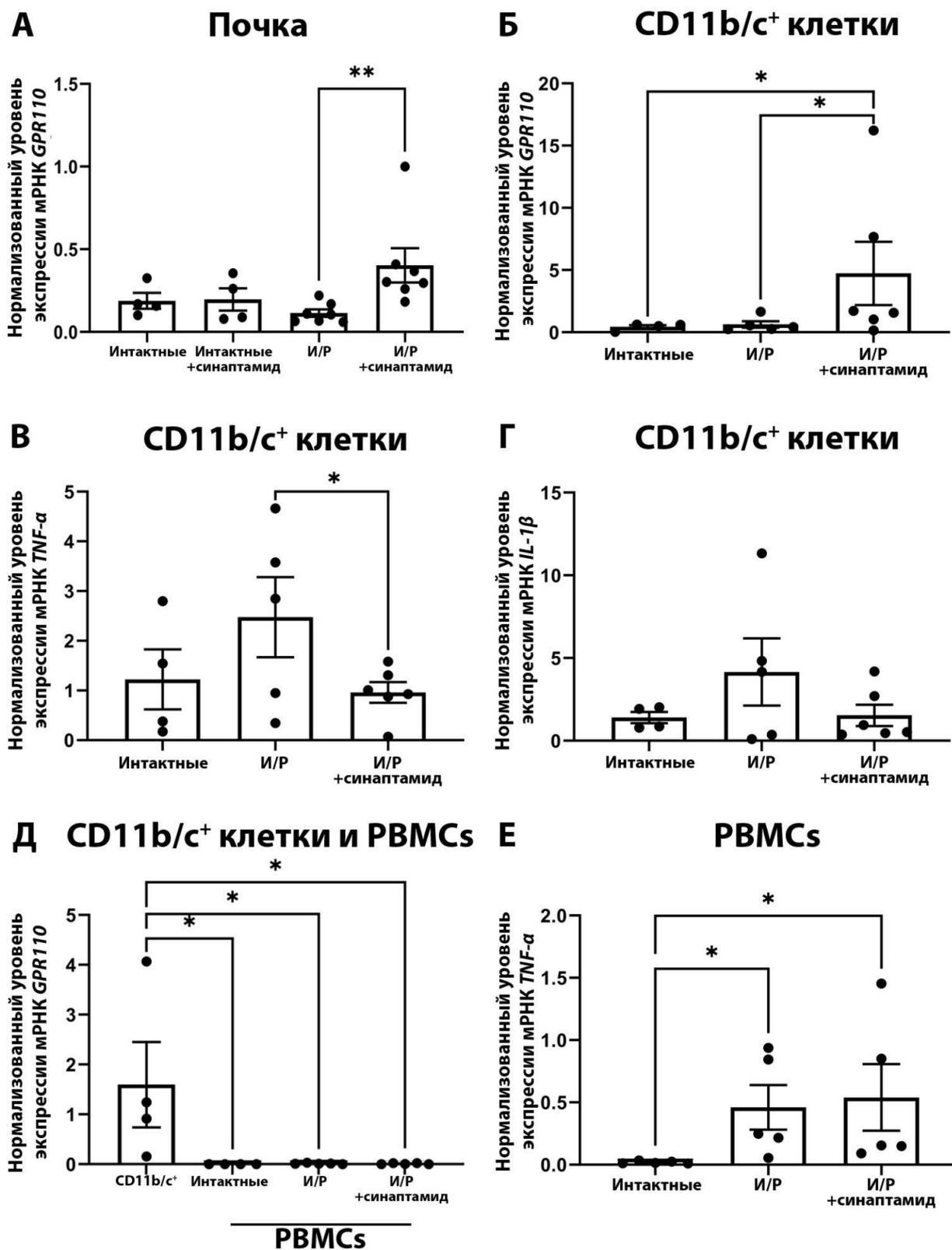
### **4.2.3. Синаптамид оказывает свое противовоспалительное действие через рецептор GPR110 нейтрофилов**

Недавно было показано, что этаноламид докозагексаеновой кислоты может снижать воспаление за счет сигналинга через GPR110 в иммунных клетках [Park, Chen, Kim, 2019]. В связи с этим мы исследовали экспрессию этого рецептора в клетках, полученных из почек, и продемонстрировали, что синаптамид значительно увеличивал экспрессию GPR110 на фоне И/Р, которая не повышалась у крыс, получавших синаптамид без индукции ОПП (Рис. 22А).

Чтобы проанализировать, какие клетки могут быть ответственны за такое увеличение экспрессии GPR110, мы получили CD11b/c<sup>+</sup> клетки, которые в основном представляют собой популяции нейтрофилов и макрофагов [Spitzer, Zhang, 1996]. Мы продемонстрировали, что экспрессия мРНК GPR110 была повышена в клетках CD11b/c<sup>+</sup> из почек крыс, подвергшихся И/Р и введению синаптамида (Рис. 22Б). Мы также исследовали экспрессию провоспалительных маркеров TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  в клетках CD11b/c<sup>+</sup>, которая имела тенденцию к снижению после введения синаптамида на фоне И/Р (Рис. 22В,Г).

Кроме того, мы исследовали экспрессию мРНК GPR110 и TNF- $\alpha$  в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMCs). Мы обнаружили, что GPR110 не экспрессировался в PBMCs, в отличие от клеток CD11b/c<sup>+</sup> из почечной ткани (Рис. 22Д). Следует отметить, что экспрессия мРНК GPR110 не активировалась в PBMCs через 48 ч после И/Р или И/Р с лечением синаптамидом. Кроме того, синаптамид не оказывал влияние на экспрессию TNF- $\alpha$  в этих клетках после ишемии (Рис. 22Е). Основываясь на полученных данных, мы предполагаем, что противовоспалительные эффекты синаптамида опосредуются GPR110 в клетках CD11b/c<sup>+</sup>, которые представлены в основном нейтрофилами и макрофагами. Поскольку большинство клеток, инфильтрирующих в почку после ишемии, являются нейтрофилами, основной

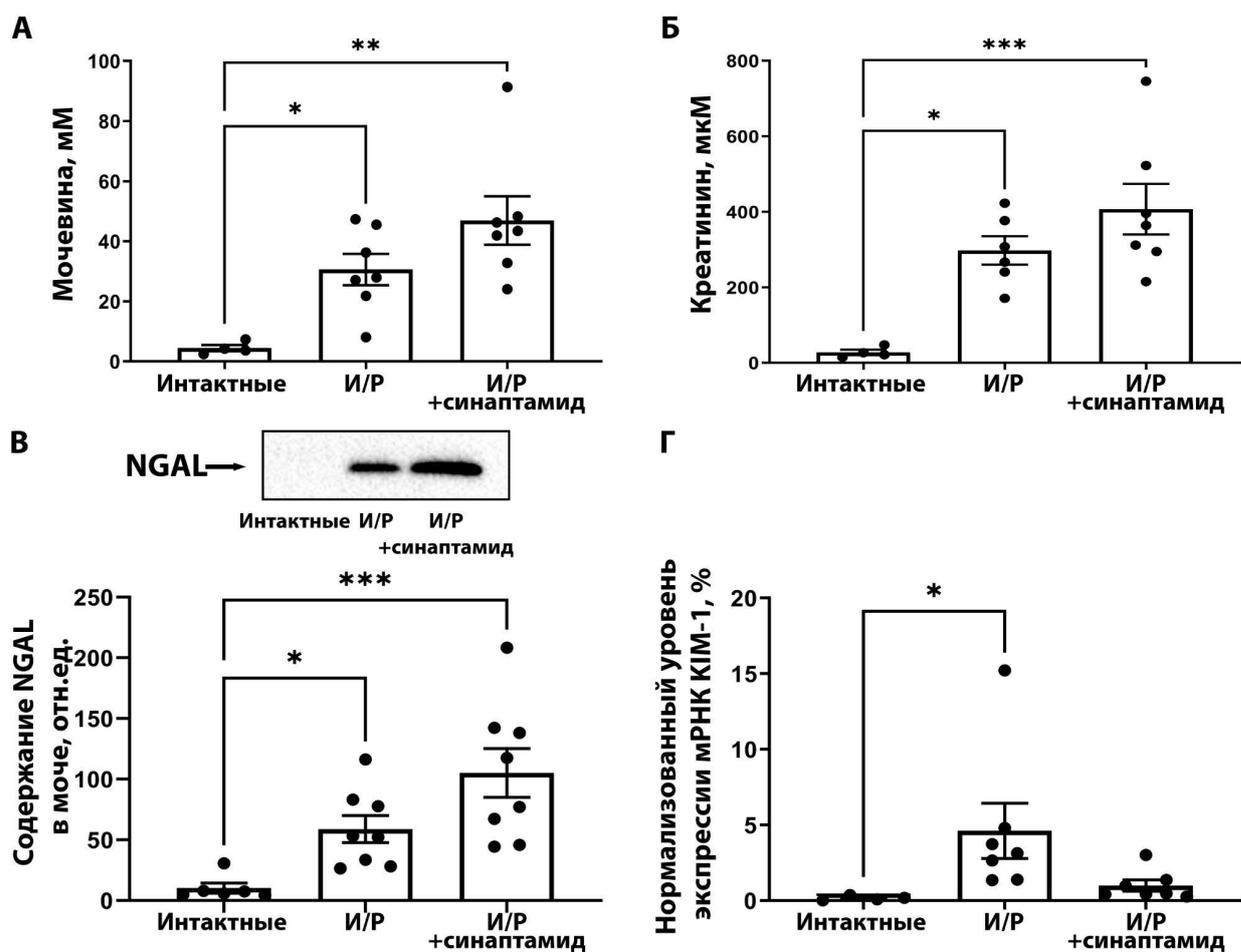
эффект синаптамида может заключаться в модуляции воспалительной реакции, опосредованной именно этими клетками.



**Рис. 22.** Связанные с GPR110 противовоспалительные эффекты синаптамида при ишемии/реперфузии почек. (А) Экспрессия мРНК GPR110 в ткани почки. (Б) Экспрессия мРНК GPR110 в CD11b/c<sup>+</sup> клетках из почки. (В) Экспрессия мРНК TNF-α в CD11b/c<sup>+</sup> клетках из ткани почки. (Г) Экспрессия мРНК IL-1β в CD11b/c<sup>+</sup> клетках из ткани почки. (Д) Сравнение экспрессии мРНК GPR110 в CD11b/c<sup>+</sup> клетках из интактной почечной ткани и PBMCs, полученных из крови интактных крыс, через 48 часов после ишемии/реперфузии или через 48 часов после ишемии/реперфузии с лечением синаптамидом. (Е) Экспрессия мРНК TNF-α в PBMCs. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (однофакторный ANOVA с множественным сравнением по Тьюки или тест Краскела–Уоллиса с множественными сравнениями по Данну).

#### 4.2.4. Эффекты синаптамида на тяжесть ОПП

Мы оценили тяжесть ОПП без лечения синаптамидом или с его применением (Рис. 23). Мы обнаружили, что концентрации BUN и SCr значительно увеличились через 48 ч после И/Р почек, а лечение синаптамидом не уменьшало нарушения функции почек, несмотря на его противовоспалительный эффект (Рис. 23А,Б). Мы также проанализировали более чувствительный маркер повреждения почек, липокалин, ассоциированный с нейтрофильной желатиназой (NGAL), в образцах мочи через 24 ч после И/Р (Рис. 23В). Мы наблюдали значительное повышение уровня NGAL в моче крыс из групп “I/R” и “I/R+синаптамид”. Мы также оценили экспрессию другого маркера повреждения KIM-1 в почечной ткани через 48 ч после повреждения и продемонстрировали, что экспрессия мРНК KIM-1 была значительно повышена при И/Р и имела тенденцию к снижению в почках крыс, получавших синаптамид при И/Р (Рис. 23Г).



**Рис. 23.** Оценка развития ОПП у крыс после ишемии и лечения синaптамидом. (А) Сывороточное содержание BUN или (Б) SCr у интактных крыс, через 2 суток после повреждающего воздействия и терапии синaптамидом. (В) Уровни NGAL в моче через сутки после повреждения, оцененные с помощью вестерн-блоттинга. (Г) Экспрессия мРНК KIM-1 через 2 суток после повреждения и терапии. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,01$  (однофакторный ANOVA с множественным сравнением по Тьюки или тест Краскела–Уоллиса с множественными сравнениями по Данну).  $n(\text{интактные}) = 5$ ,  $n(\text{I/P}) = 7-8$ ,  $n(\text{I/P+синaптамид}) = 7-8$ .

### **4.3. Развитие ОПП у новорожденных при системном воспалении**

#### **4.3.1. Повреждение почек у новорожденных крысят при действии ЛПС в разных дозах**

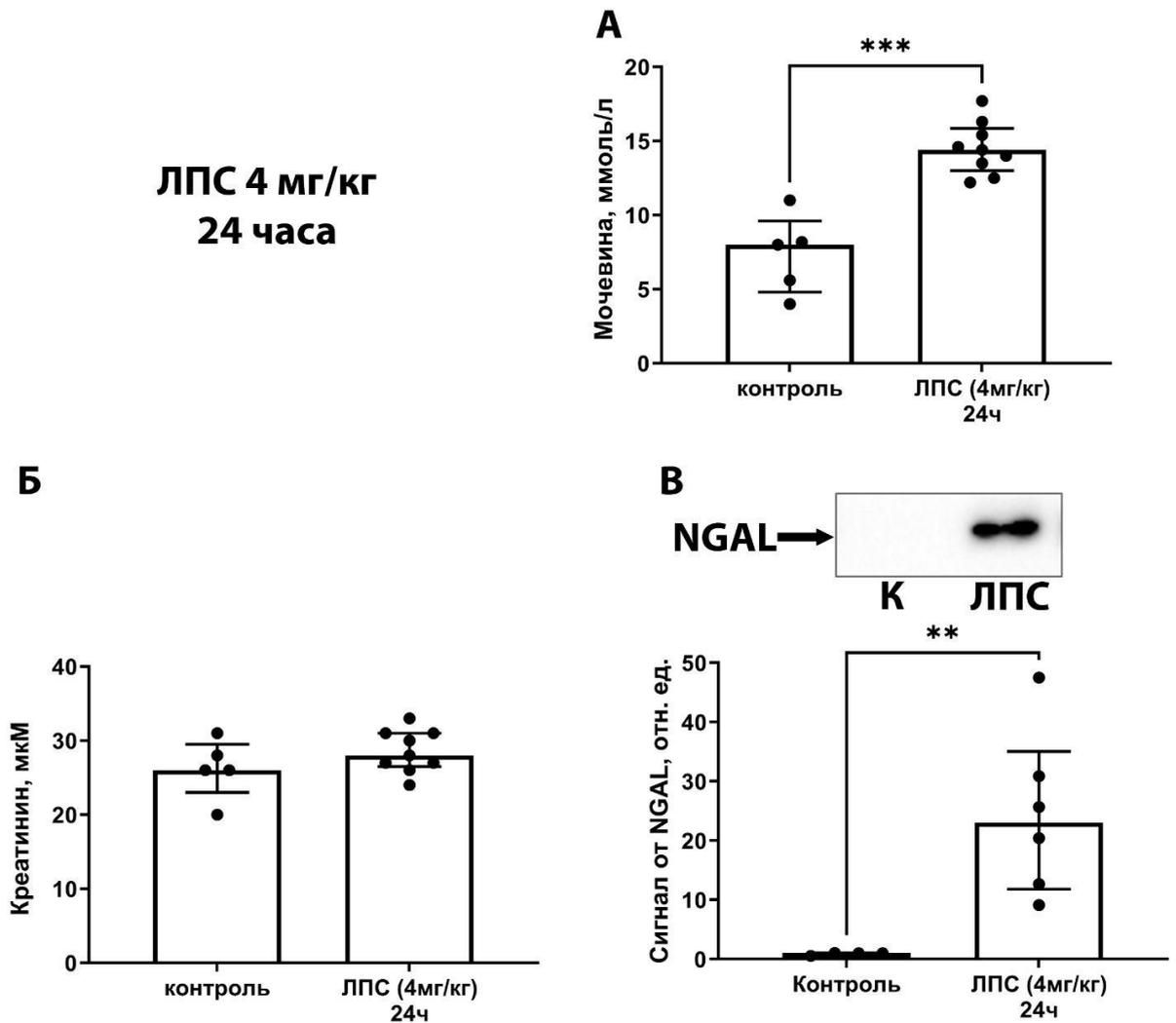
В данной работе моделировали эндотоксин-индуцированное почечное повреждение у новорожденных крыс путем однократного введения ЛПС в дозе 4 мг/кг, которая используется для моделирования системного воспаления. Для оценки почечной функции измеряли мочевины в сыворотке крови в качестве маркера снижения клубочковой фильтрации. Мочевина является основным конечным продуктом азотистого обмена у млекопитающих, образуется при деградации белков и аминокислот и почти полностью выводится с мочой. Через 24 часа после введения ЛПС в дозе 4 мг/кг наблюдается статистически значимое (более чем в 2 раза) увеличение концентрации мочевины в крови крысят по сравнению с контролем (Рис. 24А), что является показателем функциональных нарушений в почке.

В то же время было обнаружено, что концентрация креатинина в сыворотке животных, получивших внутрибрюшинную инъекцию ЛПС, достоверно не отличается от контроля (Рис.24Б). Креатинин является маркером, наиболее активно используемым в настоящий момент в клинике для диагностики почечной недостаточности. Он образуется с относительно постоянной скоростью в результате неферментативной дегидратации мышечного креатина и свободно фильтруется клубочками, не реабсорбируясь почечными канальцами. Данный маркер в первую очередь отражает изменения в скорости клубочковой фильтрации почки и не позволяет детектировать ранние стадии повреждения почки. Кроме того, количество продуцируемого креатинина приблизительно пропорционально мышечной массе, а у новорожденных крысят часто уровень сывороточного креатинина отражает уровень данного вещества в крови матери. Известно, что сывороточный креатинин у крысят значительно повышается при потере более 50% функциональных нефронов, поэтому при менее значительных

повреждениях его концентрация может не увеличиваться. Можно предполагать, что при моделировании системного воспаления путем введения 4 мг/кг ЛПС ОПП развивается в относительно легкой степени, которая не вызывает значимого увеличения сывороточного креатинина.

Как было показано в различных исследованиях [Mussap и др., 2014; Schinstock и др., 2013], для детектирования ранних стадий повреждения больше подходит маркер почечного повреждения NGAL, поскольку он выявляет ОПП при относительно слабом повреждении почечных канальцев и не зависит от особенностей метаболизма, в отличие от креатинина и мочевины.

Данный маркер практически не детектируется в моче новорожденных крыс, тогда как введение ЛПС в дозе 4 мг/кг вызывает появление NGAL в моче через 24 часа после инъекции (Рис. 24В). NGAL, принадлежащий к семейству липокалинов, фильтруется из крови, но затем реабсорбируется в проксимальных канальцах, таким образом, в случае здоровой почки попадание NGAL в мочу исключается. Обнаружение его в моче свидетельствует о высоком уровне повреждения почечных канальцев и подходит для детекции острой фазы ОПП. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что при сепсис-подобном ОПП нарушается реабсорбция NGAL в проксимальных канальцах. Кроме того, ряд исследований показывает, что при ОПП наблюдается синтез *de novo* непосредственно почечного NGAL эпителием почечных канальцев и экскреция его в мочу. Таким образом, обнаружение его в моче новорожденных однозначно свидетельствует о нарушении нормального функционирования и повреждении почки при инъекции ЛПС.

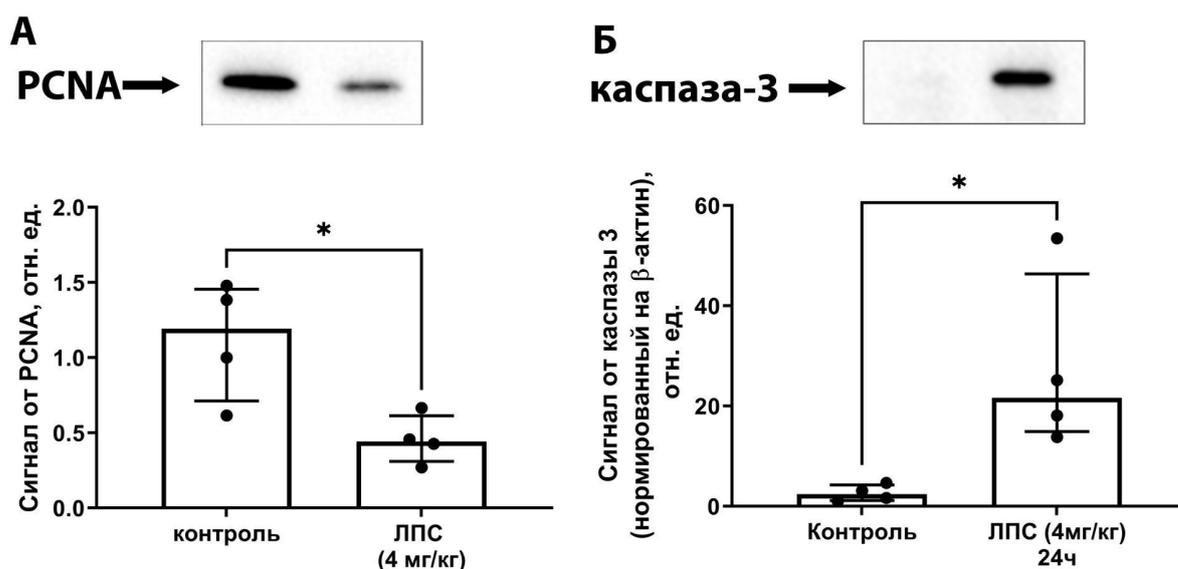


**Рис 24.** Оценка маркеров почечного повреждения, пролиферации и апоптоза через 24 часа после однократного введения ЛПС в дозе 4 мг/кг новорожденным крысам. (А) Концентрация мочевины в сыворотке новорожденных крыс ( $n(\text{контроль}) = 5$ ,  $n(\text{ЛПС}) = 9$ ). (А) Концентрация креатинина в сыворотке новорожденных крыс ( $n(\text{контроль}) = 5$ ,  $n(\text{ЛПС}) = 9$ ). (В) Уровень NGAL в моче контрольных новорожденных крыс ( $n=4$ ) и через 24 ч после однократной инъекции 4 мг/кг ЛПС ( $n=6$ ).  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  (Критерий Манна-Уитни)

Для оценки пролиферативного потенциала клеток почки крысят после воздействия ЛПС был проанализирован маркер PCNA. Экспрессия белка PCNA наблюдается только в делящихся клетках, поэтому его количество прямо пропорционально активности пролиферации в ткани. При анализе

гомогенатов почек крыс было выявлено, что в интактном органе у новорожденных детектируется большое количество PCNA, то есть велика доля делящихся клеток. Это отличает неонатальную почку от почки взрослого животного, где пролиферация практически не наблюдается [Певзнер и др., 2018]. Через 24 часа после однократного введения ЛПС в дозе 4 мг/кг наблюдается значительное уменьшение содержания маркера пролиферации PCNA в почках новорожденных крыс по сравнению с контрольными животными, что свидетельствует о нарушении процессов деления клеток в почке (Рис. 25А). Важно отметить, что повреждающее воздействие ЛПС на неонатальную почку происходит на фоне активно пролиферирующих вследствие процесса нефрогенеза клеток, что отличает ОПП у новорожденных от аналогичной ситуации у взрослых крыс [Певзнер и др., 2018], где ОПП наоборот, вызывает активацию пролиферации для регенерации органа путем замены поврежденных эпителиальных клеток путем дифференцировки в эпителиоциты [Andrianova и др., 2019].

Известно, что гибель эпителиоцитов при ОПП может происходить в том числе путем индукции апоптоза. Для оценки апоптоз-индуцированной гибели клеток в почечной ткани при моделировании эндотоксин-индуцированного почечного повреждения был проанализирован уровень активной (расщепленной) каспазы-3, которая считается ключевым ферментом в процессе каспаз-зависимого апоптоза. Выявлено повышение уровня расщепленной каспазы-3 через 24 ч после введения ЛПС в дозе 4 мг/кг по сравнению с контролем (Рис. 25Б), что свидетельствует об активации терминальных стадий апоптоза. Можно заключить, что сепсис-подобное состояние индуцирует острое почечное повреждение за счет апоптоза в клетках нефрона. Также можно сделать вывод, что при эндотоксин-индуцированном ОПП у неонатальных крыс апоптоз протекает через путь, опосредуемый каспазой-3.



**Рис. 25.** Изменение маркеров пролиферации и апоптоза через 24 часа после однократного введения ЛПС в дозе 4 мг/кг. (А) Уменьшение содержания PCNA в ткани почки неонатальных крыс в контроле ( $n=4$ ) через сутки после инъекции ЛПС в дозе 4 мг/кг ( $n=4$ ), оцененное методом вестерн блоттинга. (Б) Повышение уровня активной каспазы-3 в гомогенатах почек крыс в контроле ( $n=4$ ) и через сутки после инъекции 4 мг/кг ЛПС в контроле ( $n=4$ ), оцененное методом вестерн блоттинга. Представлены репрезентативные иммуноблоты образцов гомогенатов почек и денситометрический анализ специфических пятен.  $*p < 0.05$  (Критерий Манна-Уитни или непарный  $t$ -test)

Таким образом, в первой серии экспериментов было показано, что доза ЛПС 4 мг/кг вызывает выраженное ОПП у новорожденных крыс. Поскольку в данной работе мы хотели оценить влияние терапии антибиотиками на развитие ЛПС-индуцированного ОПП, в том числе возможное аддитивное действия нефротоксических антибиотиков и системного воспаления, то была поставлена задача подобрать дозу ЛПС, которая вызывала бы достаточно слабое ОПП, чтобы на его фоне было возможным детектировать дополнительное повреждение от антибиотиков. Для этого в данной работе было исследовано развитие ОПП от введения вдвое меньшей дозы ЛПС (2 мг/кг).

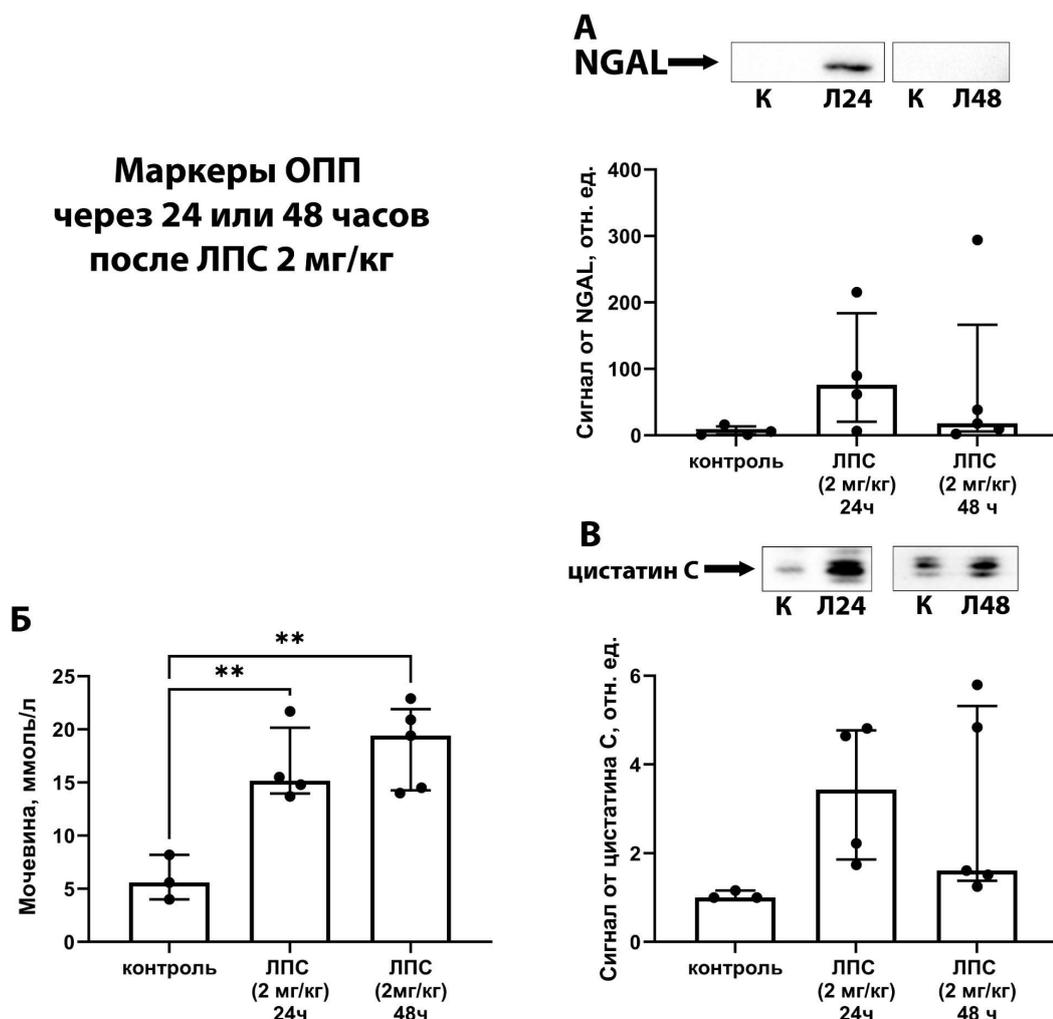
Было выявлено, что однократное введение 2 мг/кг ЛПС вызывает появление маркера ОПП NGAL в моче новорожденных крыс через 24 часа после инъекции (Рис. 26А), что свидетельствует о развитии повреждения. То есть повреждение почек происходило на очень умеренном уровне и гетерогенность животных по устойчивости к ОПП не позволяет получить значимые различия.

Кроме того, через 48 часов после введения 2 мг/кг ЛПС значительного повышения маркера NGAL в моче не наблюдалось практически у всей экспериментальной группы (Рис. 26А). Таким образом, повышенный уровень маркера NGAL выявляется через сутки после повреждающего воздействия ЛПС, но не через 48 ч. Этот факт можно связать с тем, что появление в моче данного маркера характерно для ранних стадий повреждения, а на вторые сутки в случае не очень тяжелого ОПП его количество начинает снижаться.

Одновременно было показано, что концентрация мочевины в крови значительно возрастала через 48 ч после внутрибрюшинного введения ЛПС в дозе 2 мг/кг, что свидетельствует о функциональных нарушениях в почке (Рис. 26Б).

Поскольку ОПП при использовании данной дозы ЛПС находилось на грани детекции (что и являлось целью уменьшения дозы), то нами был дополнительно проанализирован еще один белковый маркер ОПП, а именно уровень маркера цистатина С в сыворотке крови. Увеличение концентрации данного маркера в крови может свидетельствовать о нарушении экскретирующей функции почек. Через сутки после введения 2 мг/кг ЛПС наблюдалось повышение количества данного маркера, но тем не менее его уровень в крови экспериментальных животных достоверно не отличался от контрольной группы (Рис. 26В). Через 48 часов после воздействия также не выявлялось достоверного повышения уровня цистатина С (Рис. 26В). Таким образом, единственным значимо изменяющимся маркером ОПП и почечной дисфункции при введении ЛПС в дозе 2 мг/кг, стала концентрация мочевины

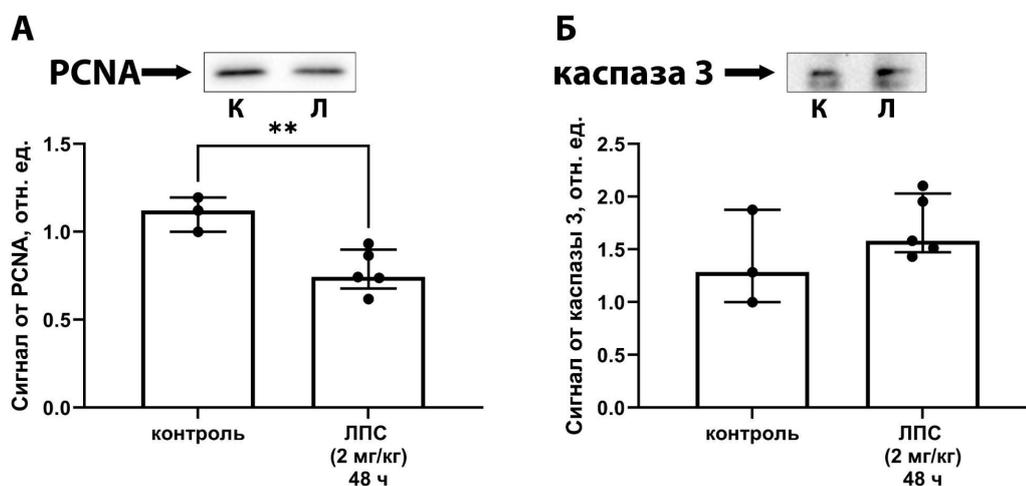
в крови. Остальные маркеры либо не изменялись, либо изменялись статистически не значимо. Можно заключить, что данная доза ЛПС для новорожденных крысят является субтоксической и может использоваться для дальнейших экспериментов по выявлению аддитивного патологического действия.



**Рис 26.** Оценка маркеров почечного повреждения, пролиферации и апоптоза через 24 или 48 часов после однократного введения ЛПС в дозе 2 мг/кг новорожденным крысам. (А) Уровень NGAL в моче контрольных новорожденных крыс ( $n=4$ ), через 24 ч ( $n=4$ ) и 48 ч ( $n=5$ ) после однократной инъекции 2 мг/кг ЛПС. (Б) Концентрация мочевины в сыворотке новорожденных крыс ( $n(\text{контроль}) = 3$ ,  $n(\text{ЛПС 24 ч}) = 4$ ,  $n(\text{ЛПС 48 ч}) = 4$ ). (В) Уровень цистатина С в сыворотке новорожденных крыс ( $n(\text{контроль}) = 3$ ,  $n(\text{ЛПС 24 ч}) = 4$ ,  $n(\text{ЛПС 48 ч}) = 4$ ). (В)  $**p < 0.01$  (однофакторный дисперсионный анализ с использованием теста множественных сравнений Тьюки)

Поскольку мы показали, что при действии 4 мг/кг ЛПС происходит снижение пролиферативного потенциала клеток почки новорожденных крыс, данный параметр также был проанализирован у новорожденных крысят, получавших 2 мг/кг ЛПС. Через 48 часов после однократного введения ЛПС в дозе 2 мг/кг крысам 4-5-дневного возраста наблюдается значительное уменьшение маркера пролиферации PCNA в почках экспериментальных крыс по сравнению с контрольными животными (Рис. 27А), что свидетельствует об уменьшении числа делящихся клеток в почке.

Аналогичным образом, как и в модели с введением 4 мг/кг ЛПС, было проанализировано количество активированной каспазы-3 в почке. При анализе апоптотической активности было показано, что после однократного введения ЛПС в дозе 2 мг/кг через 48 ч уровень активированной каспазы-3, фермента, участвующего в терминальных стадиях апоптотического пути гибели клетки, в ткани почки практически не изменялся по сравнению с контрольной группой (Рис. 27Б).



**Рис 27.** Изменение маркеров пролиферации и апоптоза через 48 часа после однократного введения ЛПС в дозе 2 мг/кг. (А) Уменьшение содержания PCNA в ткани почки неонатальных крыс в контроле (n=3) и после 2 мг/кг ЛПС (n=5), оцененное методом вестерн блоттинга. (Б) Уровень активной каспазы-3 в гомогенатах почек крыс в контроле (n=3) и после 2 мг/кг ЛПС (n=5), оцененное методом вестерн блоттинга. Представлены репрезентативные иммуноблоты образцов гомогенатов почек и денситометрический анализ специфических пятен.  $**p < 0.05$  (непарный t-test)

#### **4.3.2. Оценка почечной функции при ОПП, вызванном системным воспалением, и терапии антибиотиками при экспериментальном моделировании**

Так как еще не найдена терапия ОПП, мы решили оценить влияние антибиотиков, которые используются при терапии сепсиса на повреждение почек. Известно, что для гентамицина нефротоксической дозой для крыс является 160 мг/кг, при их курсовом введении в течение 6 дней [Янкаускас и др., 2012]. В данной работе было исследовано действие 2 доз гентамицина – 50 мг/кг и 150 мг/кг в сочетании с введением эндотоксина в дозе 2 мг/кг. В серии предварительных экспериментов было показано, что при внутрибрюшинном введении гентамицина в дозах меньше 150 мг/кг не происходит появления маркера ОПП NGAL в моче (данные не показаны).

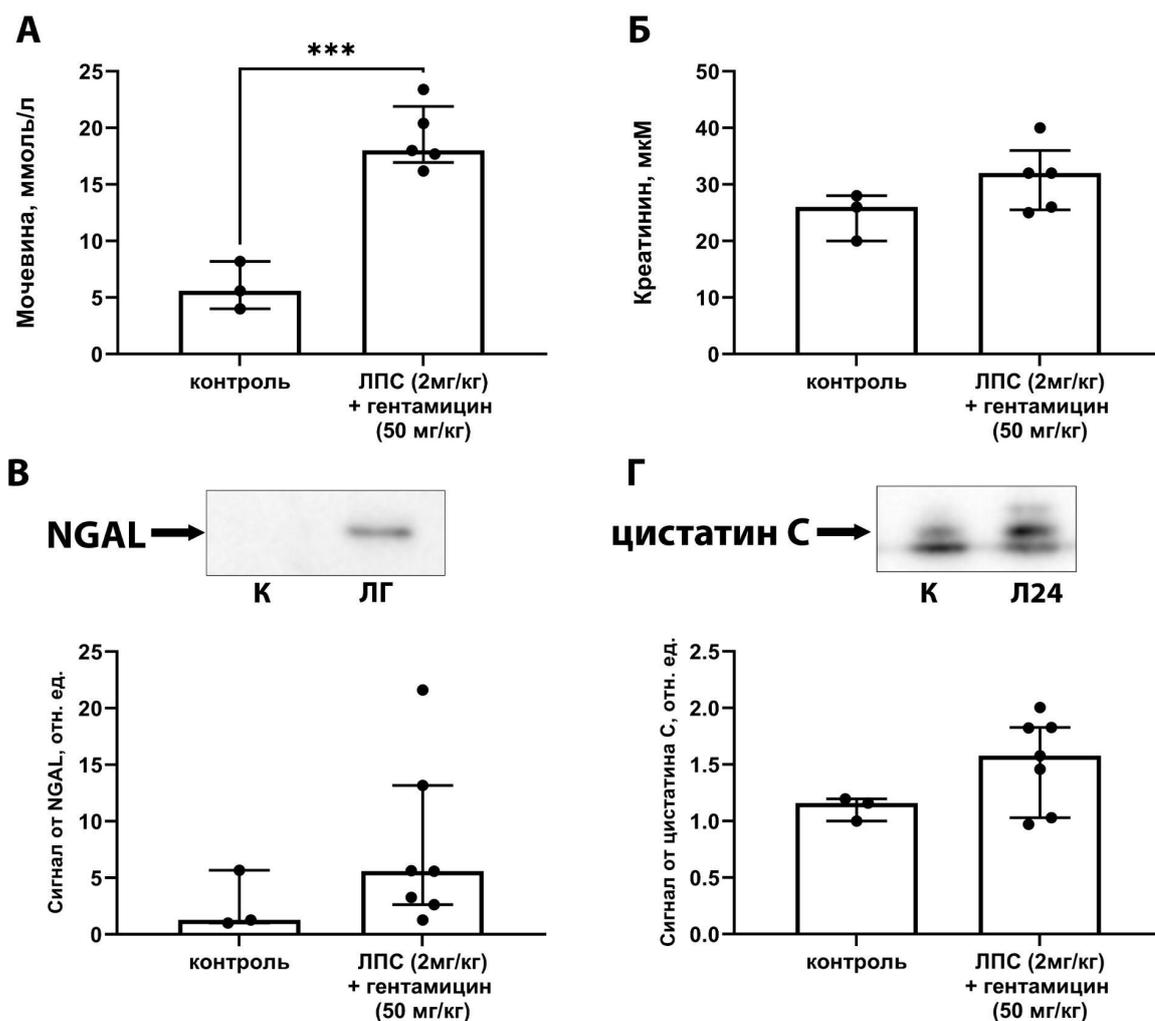
На основе экспериментов по определению дозозависимой нефротоксичности гентамицина было проверено совместное действие гентамицина и ЛПС на индукцию ОПП. В данной серии экспериментов крысам 4-5-дневного возраста вводили сначала ЛПС в дозе 2 мг/кг, а через 24 ч – гентамицин в дозе 50 мг/кг. Через 24 ч после введения гентамицина анализировали развитие ОПП.

В первую очередь развитие ОПП анализировали с помощью классического маркера функционального повреждения почек – содержания мочевины в сыворотке крови. Показано, что концентрация мочевины в крови при сочетанном воздействии ЛПС и гентамицина, введенного через 24 часа, статистически значимо возрастает (Рис. 28А), что свидетельствует о нарушении почечной функции. В то же время при данном воздействии концентрация креатинина в крови достоверно не отличается от контроля (Рис. 28Б).

Поскольку мы неоднократно показали недостаточную объективность определения креатинина и мочевины для диагностики ОПП у новорожденных при ЛПС-индуцированном системном воспалении, то мы провели

дополнительную оценку почечного повреждения с помощью анализа количества биомаркера NGAL в моче. Было показано, что у некоторых экспериментальных животных при сочетанном действии ЛПС и гентамицина в моче наблюдалось появление NGAL, что свидетельствует о развитии острого почечного повреждения (Рис. 28В). Однако для всей выборки повышение данного маркера не было достоверным. Как уже было указано, NGAL является хорошим маркером для детекции почечного повреждения на ранних стадиях, однако, в данной модели анализ мочи проводился через 48 ч после инъекции ЛПС и, соответственно, через 24 ч после инъекции гентамицина. Возможно, уровень NGAL у большинства подопытных животных уже снизился после воздействия ЛПС, и мы наблюдаем повышенный уровень маркера ОПП лишь в нескольких образцах. Это подтверждается приведенными выше результатами определения NGAL в моче через 48 ч после введения 2 мг/кг ЛПС без введения гентамицина (Рис. 26А), когда уровень данного маркера понижался по сравнению с таковым через 24 ч.

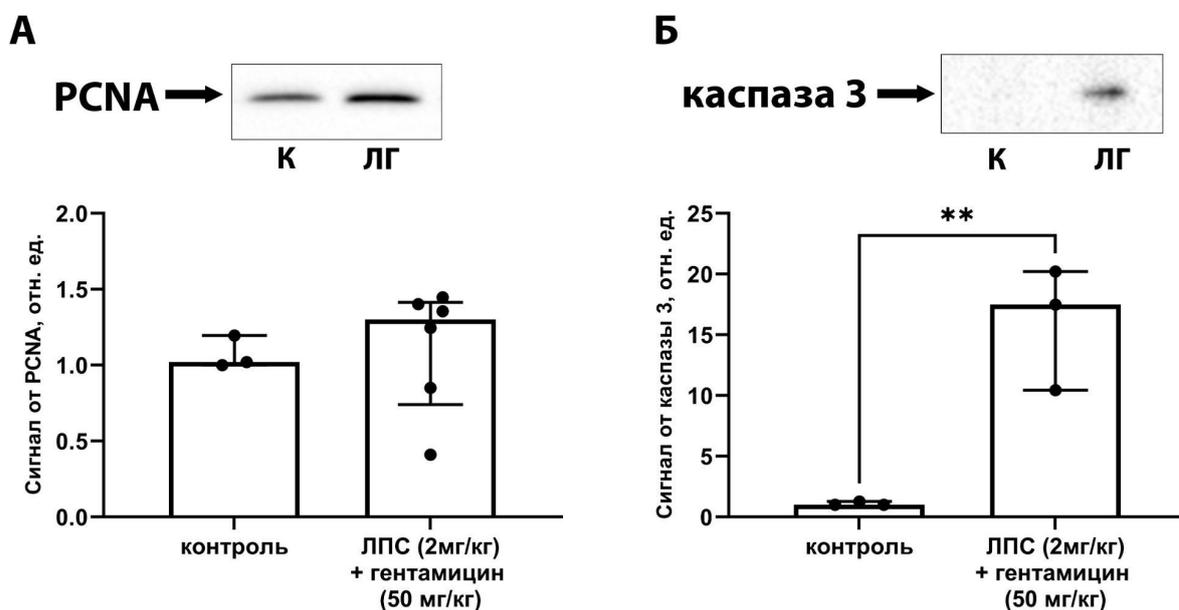
Дополнительный анализ еще одного маркера ОПП показал, что при сочетании воздействий ЛПС 2 мг/кг и гентамицина 50 мг/кг (интервал между введениями 24 ч) выраженных изменений в уровне цистатина С в сыворотке крови не было (Рис. 28).



**Рис 28.** Оценка тяжести ОПП после последовательного введения ЛПС (2 мг/кг) и гентамицина (50 мг/кг) через 24 часа. (А) Концентрация мочевины в сыворотке новорожденных крыс ( $n(\text{контроль}) = 3$ ,  $n(\text{ЛПС}+\text{гентамицин}) = 5$ ). (Б) Концентрация креатинина в сыворотке новорожденных крыс ( $n(\text{контроль}) = 3$ ,  $n(\text{ЛПС}+\text{гентамицин}) = 5$ ). (В) Уровень NGAL в моче контрольных новорожденных крыс ( $n=3$ ) и после введения ЛПС и гентамицина (50 мг/кг) ( $n=6$ ), оцененный методом вестерн-блоттинга. (Г) Уровень цистатина С в сыворотке новорожденных крыс ( $n(\text{контроль}) = 3$ ,  $n(\text{ЛПС 24 ч}) = 4$ ,  $n(\text{ЛПС 48 ч}) = 4$ ). (В)  $***p < 0.05$  (непарный  $t$ -test)

При последовательном действии ЛПС (2 мг/кг) и гентамицина (50 мг/кг) отчетливой тенденции к изменению пролиферативного потенциала не выявляется. Содержание маркера PCNA в почках экспериментальных крыс группы практически не отличалось от контрольных животных (Рис. 29А).

При оценке индукции апоптоза по уровню расщепленной (активированной) каспазы-3 выявлено повышение содержания данного белка в гомогенатах почек экспериментальной группы, что говорит об активации апоптотических путей в тканях (Рис. 29Б).



**Рис 29.** Оценка пролиферации и индукции апоптоза после однократного введения ЛПС в дозе 2 мг/кг и последовательного введения гентамицина в дозе 50 мг/кг через 24 часа. (А) Уменьшение содержания PCNA в ткани почки неонатальных крыс в контроле ( $n=3$ ) и в группе “ЛПС+гентамицин” ( $n=6$ ), оцененное методом вестерн блоттинга. (Б) Уровень активной каспазы-3 в гомогенатах почек крыс в контроле ( $n=3$ ) и в группе “ЛПС+гентамицин” ( $n=3$ ), оцененное методом вестерн блоттинга. Представлены репрезентативные иммуноблоты образцов гомогенатов почек и денситометрический анализ специфических пятен.  $**p < 0.05$  (непарный  $t$ -test)

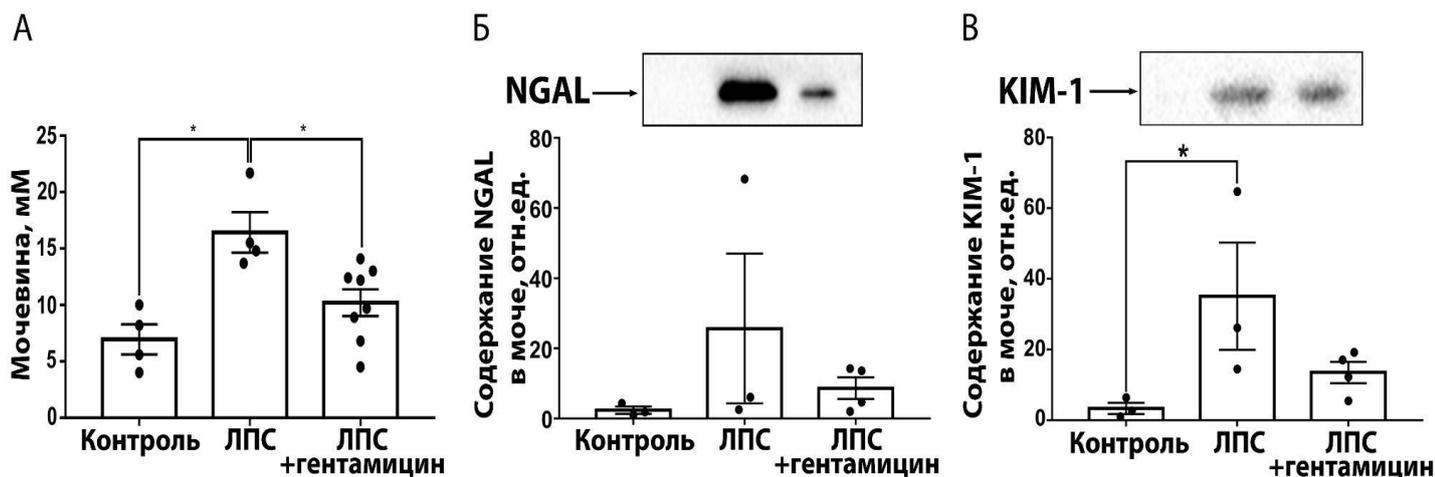
Мы можем сделать вывод, что при анализе рассматриваемых маркеров достоверные отличия выявлены только в концентрации мочевины в крови. Повышение мочевины при совместном введении ЛПС (2 мг/кг) и гентамицина в дозе 50 мг/кг (интервал между введениями 24 ч, анализ маркера – через 24 ч после гентамицина) схоже с ответом новорожденных крыс на ЛПС 2 мг/кг

через 48ч. Таким образом, усиления ОПП при введении антибиотика через 24 часа после воздействия ЛПС не обнаружено.

Кроме того, необходимо отметить, что при сочетанном действии ЛПС (2 мг/кг) и гентамицина в дозе 50 мг/кг не выявлялось изменение пролиферативного потенциала, что отличается от эффекта снижения уровня PCNA, оказываемого чистым ЛПС, и позволяет даже ставить вопрос о снижении эффекта ЛПС на пролиферацию под действием гентамицина.

Следующим этапом стала оценка совместного действия ЛПС и гентамицина в модели, где интервал между введениями двух препаратов был сокращен до 1 часа, а доза гентамицина была увеличена до 150 мг/кг. Эта дозировка также не оказывала нефротоксический эффект при однократном введении без ЛПС (данные не представлены).

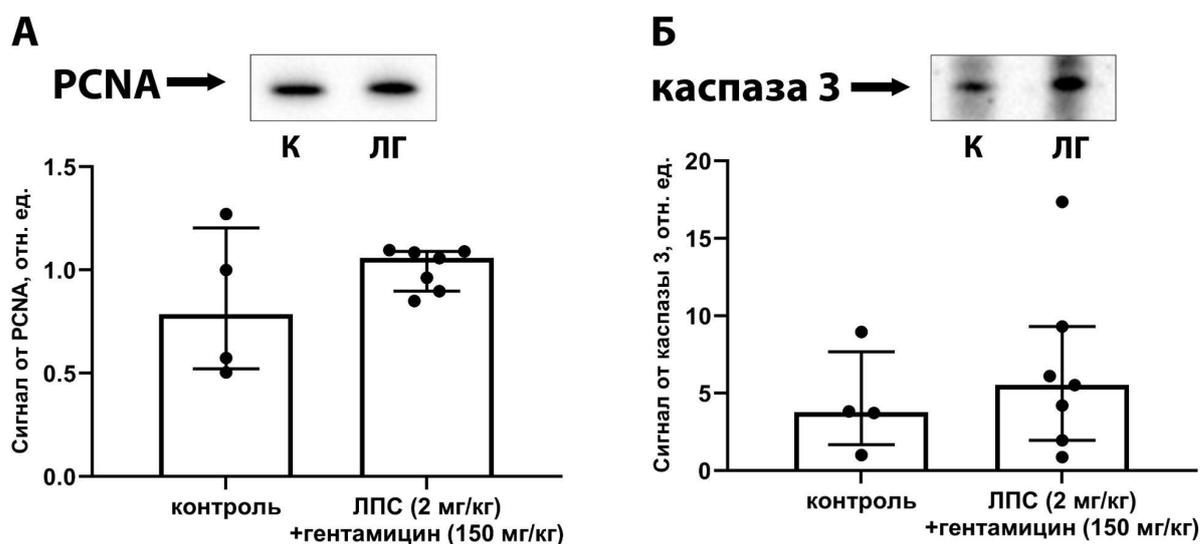
Мы показали, что введение ЛПС увеличивало концентрацию BUN более чем в 2 раза через 1-2 дня после лечения, что можно рассматривать как легкое ОПП. Терапия гентамицином значительно снизила уровень мочевины по сравнению с группой, получавшей только ЛПС, что указывает на неожиданный нефропротекторный эффект гентамицина (Рис. 30А). Кроме того, эндотоксинемическое повреждение приводило к NGAL и KIM-1 в моче, которые являются дополнительными биомаркерами повреждения почек (Рис. 30Б, В). KIM-1 трансмембранный белок, который обычно не присутствует в клетках проксимальных канальцев, но при повреждении почек экспрессируется на апикальной мембране, отщепляется и выделяется в мочу. Лечение гентамицином также имело тенденцию к снижению уровня этих маркеров в моче.



**Рис. 30.** Влияние терапии гентамицином на сепсис-подобное ОПП. (А) Содержание BUN в сыворотке. \*  $p$ -значение  $< 0,05$  (ANOVA с использованием теста множественных сравнений Тьюки). (Б) Уровень NGAL в моче, оцененный вестерн-блоттингом. (В) Уровень KIM-1, оцененный вестерн-блоттингом. \*  $p$ -значение  $< 0,05$  (тест Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями по Данну).

Как и в предыдущей серии экспериментов в данной модели был проанализирован пролиферативный потенциал ткани почек. Было обнаружено, что уровень маркера PCNA, отражающего количество делящихся клеток, в экспериментальной группе не отличался от значений в контрольной группе (Рис. 31А). Таким образом, при совместном действии ЛПС и гентамицина не было выявлено ухудшения пролиферативного потенциала в ткани почки, в отличие от действия чистого эндотоксина.

Исследование индукции апоптоза после последовательного действия ЛПС (2 мг/кг) и гентамицина (150 мг/кг) показало, что статистически значимого изменения содержания активированной каспазы-3 не наблюдалось, хотя у некоторых экспериментальных животных уровень данного фермента значительно повышался (Рис.31Б).



**Рис 31.** Оценка пролиферации и индукции апоптоза после однократного введения ЛПС в дозе 2 мг/кг и последовательного введения гентамицина в дозе 150 мг/кг через 1 час. (А) Содержания PCNA в ткани почки неонатальных крыс в контроле ( $n=4$ ) и в группе “ЛПС+гентамицин” ( $n=7$ ), оцененное методом вестерн блоттинга. (Б) Уровень активной каспазы-3 в гомогенатах почек крыс в контроле ( $n=4$ ) и после 2 мг/кг ЛПС ( $n=7$ ), оцененное методом вестерн блоттинга. Представлены репрезентативные иммуноблоты образцов гомогенатов почек и денситометрический анализ специфических пятен. Критерий Манна-Уитни.

Таким образом, при совместном введении ЛПС (2 мг/кг) и гентамицина (150 мг/кг) наблюдалось статистически значимое снижение уровней NGAL и КИМ-1, а также мочевины, что говорит о нефропротекторном действии гентамицина в дозе 150 мг/кг на фоне ЛПС-индуцированного ОПП. При этом, не наблюдается уменьшения пролиферативной активности клеток почки при сочетанном действии ЛПС и гентамицина (150 мг/кг), которое описано при воздействии чистого ЛПС. То есть по данному параметру также подтверждается некоторое защитное действие гентамицина.

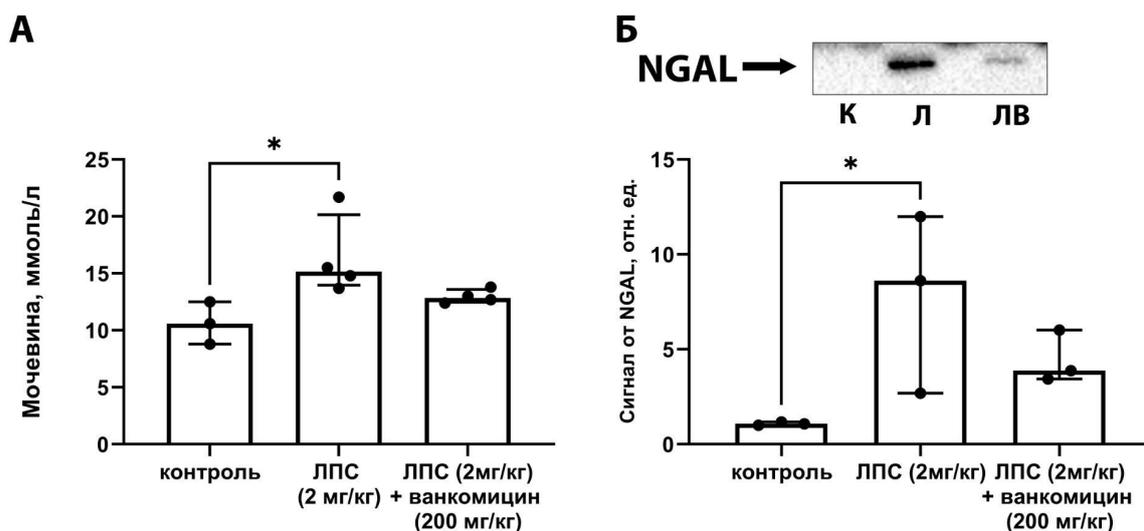
Поскольку в клинической практике гентамицин в связи с его нефротоксичностью часто заменяют на другие антибиотики, мы провели аналогичные эксперименты с одним из наиболее часто используемых в

неонатологии антибиотиком, ванкомицином. В данной серии экспериментов оценивали совместный эффект, оказываемый эндотоксином и ванкомицином (интервал между введениями 1 ч). Для оценки уровня почечного повреждения были использованы мочевины в сыворотке крови, а также уровень КИМ-1 в моче.

Для исследования использовалась доза ванкомицина 200 мг/кг, которая была выбрана исходя из анализа исследований токсичности ванкомицина для почек. Ранее было показано, что признаки острого почечного повреждения возникают при введении ванкомицина в дозе выше 300 мг/кг [Nishino et al, 2002]. Стоит отметить, что токсическое повреждение развивается при многократном введении высоких доз данного антибиотика. При его однократном введении в дозе 200 мг/кг нефротоксический эффект не проявлялся [Pais et al, 2019].

В данной работе было показано, что при действии ЛПС уровень мочевины повышался по сравнению с интактными новорожденными животными. Через 24 ч после последовательного введения ЛПС и ванкомицина (200 мг/кг), концентрация мочевины в крови не была повышена относительно контрольного уровня (Рис. 32).

Также было показано, что при действии ЛПС уровень маркера NGAL повышался по сравнению с контролем. После введения ванкомицина через 24 ч уровень данного маркера не отличался от контрольной группы. При последовательном действии ЛПС и ванкомицина содержание NGAL в моче немного повышалось относительно контрольной группы, но было сопоставимо с группой, получавшей только ЛПС (Рис. 32).



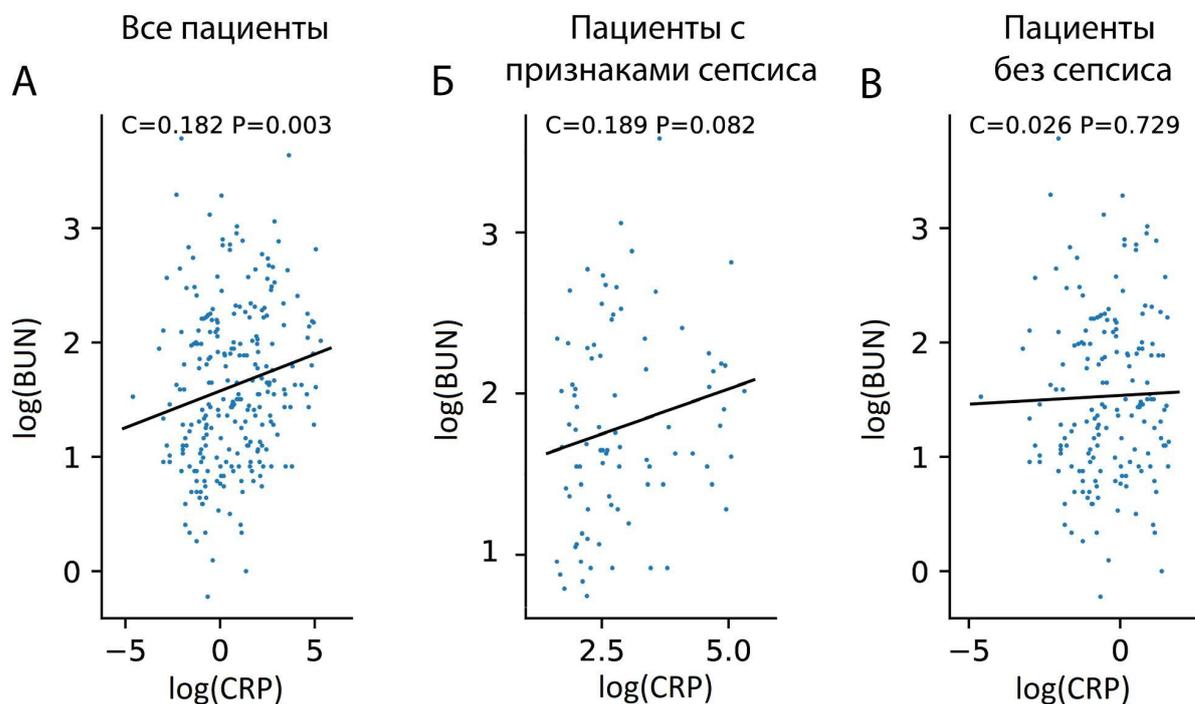
**Рис 32.** Оценка тяжести ОПП при последовательном введении ЛПС в дозе 2 мг/кг и ванкомицина в дозе 200 мг/кг. (А) Концентрация мочевины в сыворотке новорожденных крыс ( $n(\text{контроль}) = 3$ ,  $n(\text{ЛПС}) = 4$ ,  $n(\text{ЛПС}+\text{ванкомицин}) = 4$ ). (Б) Уровень NGAL в моче контрольных новорожденных крыс, оцененный методом вестерн-блоттинга. ( $n(\text{контроль}) = 3$ ,  $n(\text{ЛПС}) = 4$ ,  $n(\text{ЛПС}+\text{ванкомицин}) = 4$ ). \* $p < 0,05$  (тест Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями по Данну).

Таким образом, инъекция ванкомицина в дозе 200 мг/кг не только не усугубляла развитие ОПП на фоне ЛПС, но даже в некоторой степени снижала выраженность повышения уровня маркеров по сравнению с чистым ЛПС.

#### 4.3.3. Оценка развития ОПП и влияния терапии антибиотиками у новорожденных пациентов с признаками сепсиса

Также мы провели биоинформатический анализ данных полученных от новорожденных пациентов отделения хирургии новорожденных и показали, что наблюдается положительная корреляция между уровнем мочевины и С-реактивного белка в когорте всех пациентов (Рис. 33А). Похожая картина наблюдается при анализе группы пациентов с признаками сепсиса, при этом пациенты без сепсиса не демонстрировали такой корреляции (Рис. 33Б,В).

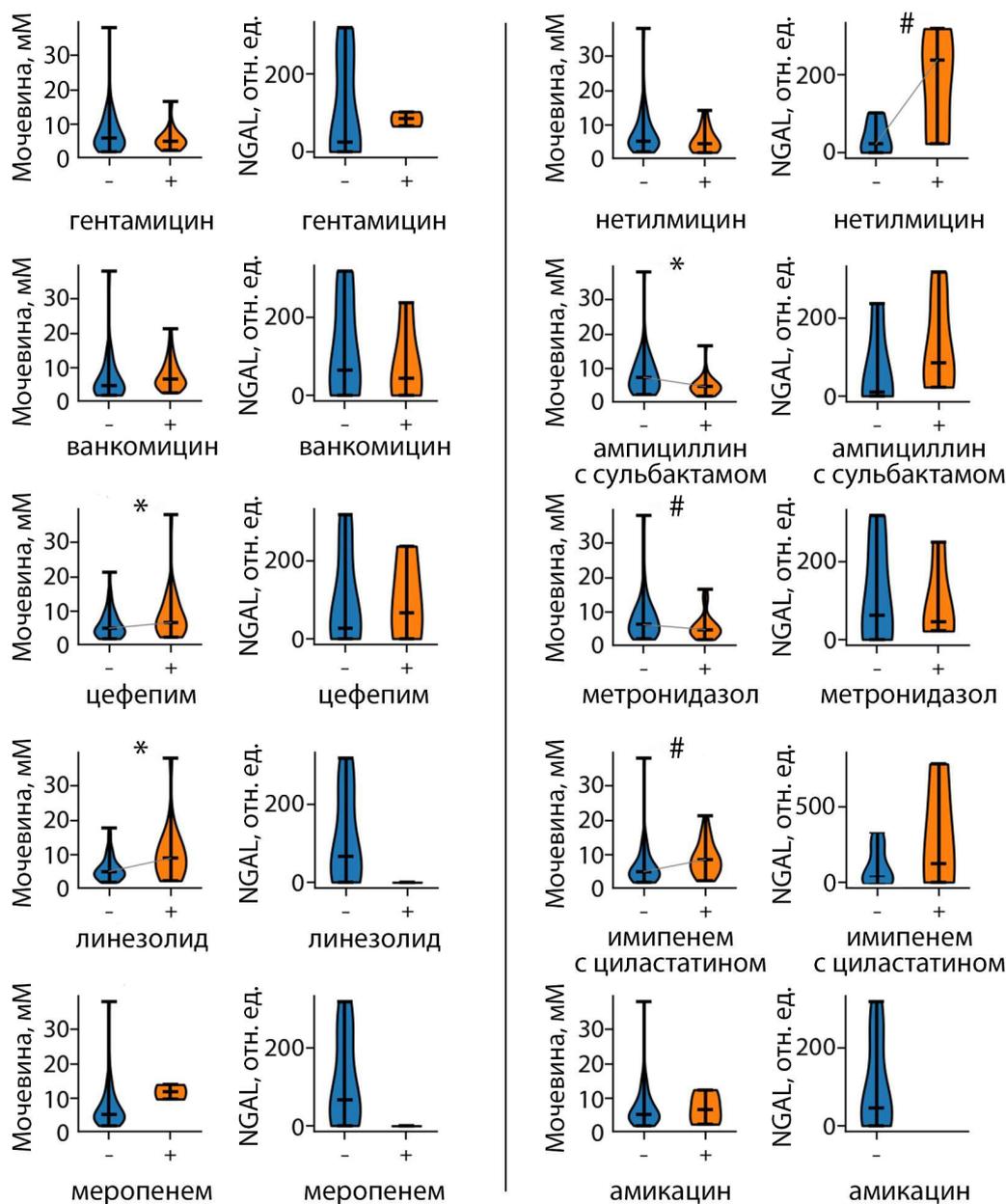
Таким образом, более высокие уровни С-реактивного белка были ассоциированы с развитием более тяжелого ОПП у пациентов в клинике.



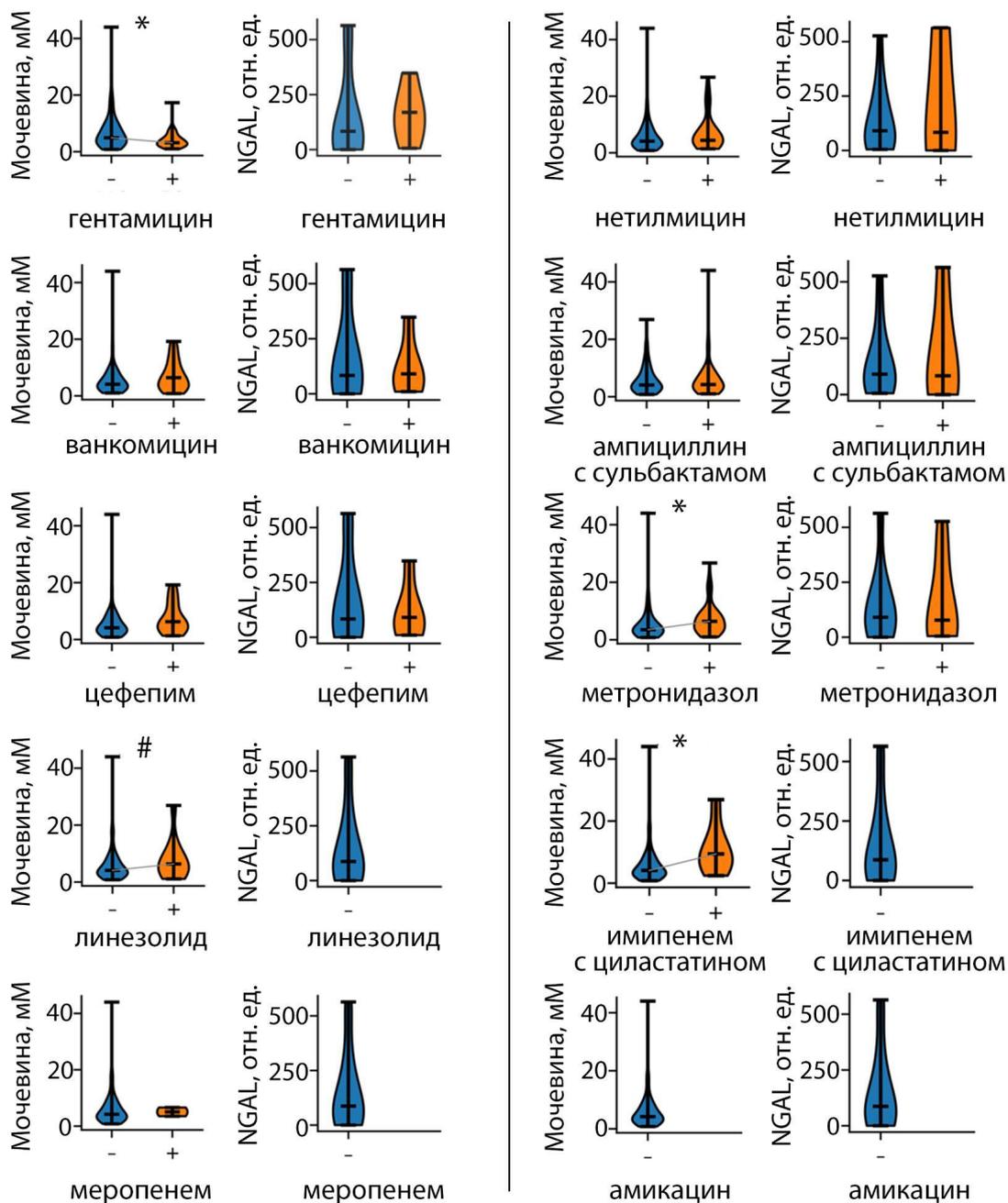
**Рис. 33.** Эффект сепсиса на маркеры ОПП. (А-В) Корреляция уровня мочевины в сыворотке с концентрацией маркера системного воспаления С-реактивного белка у (А) всех пациентов, (Б) пациентов с признаками сепсиса или (В) без них. Коэффициенты корреляции и *p*-values показаны над графиками.

Кроме того, было проанализировано положительное или отрицательное влияние специфических антибиотиков на концентрацию BUN или уровень NGAL в моче у новорожденных пациентов (рис. 34, 35). Сначала мы проанализировали когорту пациентов с признаками сепсиса (рис. 34). Мы показали, что терапия ампициллином в комбинации с сульбактамом или метронидазолом достоверно коррелировала со снижением концентрации BUN. И наоборот, терапия цефепимом, линезолидом или имипенемом в комбинации с циластатином коррелировала с повышением уровня BUN, а лечение нетилмицином повышало уровень NGAL в моче. Таким образом, некоторые антибиотики улучшали функцию почек, в то время как другие усугубляли тяжесть ОПП. Мы также проанализировали группу пациентов без сепсиса (рис. 35). Было показано, что применение гентамицина у этих

пациентов снижало концентрацию BUN. Напротив, терапия линезолидом, метронидазолом или имипенемом в комбинации с циластатином была связана с повышением уровня BUN.



**Рис. 34.** Эффект терапии антибиотиками на маркеры ОПП у пациентов с подозрением на сепсис. Уровни BUN и NGAL в моче у пациентов, не получавших (синий столбик) или получавших (оранжевый столбик) определенный антибиотик. Уровень NGAL измерен с помощью ELISA, A.U. = ng/ml. \*  $p$ -value < 0.05, #  $p$ -value < 0.1 (t-test).



**Рис. 35.** Эффект терапии антибиотиками на маркеры ОПП у пациентов без сепсиса. Уровни BUN и NGAL в моче у пациентов, не получавших (синий столбик) или получавших (оранжевый столбик) определенный антибиотик. Уровень NGAL измерен с помощью ELISA, A.U. = ng/ml. \*  $p$ -value < 0.05, #  $p$ -value < 0.1 (t-test).

## 5. ОБСУЖДЕНИЕ

В этом исследовании впервые представлен подход к моделированию очаговой ишемии почки с использованием фототромбоза сосудов почки, инициируемого световой активацией Бенгальского розового. В рамках данного исследования показано, что фототромбоз применим к почке и вызывает воспроизводимое ишемическое повреждение, которое преимущественно расположено в корковом слое почки. С помощью микро-КТ, гистологических и физиологических критериев мы оценили особенности ишемии почки, вызванной фототромбозом, как в пораженной области, так и в окружающей ткани. Мы также проанализировали долгосрочные последствия ишемии почки, вызванной фототромбозом, такие как почечный фиброз и воспаление после травмы.

Фототромботическое повреждение было достигнуто путем фотоиндуцированной активации бенгальского розового при воздействии зеленого света, что приводит к образованию свободных радикалов [Saniabadi и др., 1995], тем самым повреждая кровеносные сосуды и вызывая образование сгустков и тромбоз в мелких сосудах, что приводит к образованию локальной ишемической зоны в области, подвергшейся воздействию лазера [Li и др., 2015b]. Эти события приводят к гибели клеток в зоне поврежденного очага. Согласно литературным данным, повреждение вызвано не прямым воздействием лазерного луча на ткань почки, а связано с действием образовавшихся при световой активации Бенгальского розового АФК, что подтверждалось при окрашивании срезов почки после “ложного” фототромбоза [Ash и др., 2017; Mustafa, Jaafar, 2012].

Использование фототромбоза в качестве модели повреждения имеет некоторые ограничения. Многие из них уже описаны для моделирования на мозге, и мы предполагаем, что аналогичные особенности наблюдаются для почек. Во-первых, зеленый свет не может проникать глубже нескольких миллиметров ткани, ограничивая размер очага повреждения и его глубину

локализацию [Gunaydin, Gedik, Ayan, 2021]. Тем не менее, есть подходы, где доступ к внутренним частям органов предлагается осуществлять с помощью оптических волокон и направленного освещения интересующей области [Hosseini и др., 2018]. Второе ограничение заключается в том, что повреждение, вызванное фототромбозом, оказывает сильное влияние на стенки сосудов и вызывает ранний вазогенный отек, который обычно меньше при ишемическом повреждении [Hosseini и др., 2018]. В-третьих, при фотоактивации бенгальского розового закупоривается не один, а несколько сосудов [Schmidt и др., 2012]. Наконец, из-за поверхностного расположения и относительно небольшого размера поражения функциональные нарушения в органе могут быть не особо выражены. Тем не менее, несмотря на эти ограничения, процессы, вовлеченные в развитие фототромбоз-индуцированного повреждения, предположительно близки патогенным изменениям при ишемии [Uzdensky, 2018].

В настоящее время наиболее широко используемыми экспериментальными моделями ОПП и ХБП являются И/Р и нефротоксическое повреждение [Singh и др., 2012]. Тем не менее, модели очагового повреждения почек могут быть полезны для выявления механизмов повреждения и регенерации почечной ткани. В качестве модели локального повреждения использовалась субтотальная нефрэктомия, с помощью которой изучались как физиологические, так и молекулярные изменения в почечной ткани [Zhang, Kompa, 2014]. В связи с высокой сложностью реализации другие возможные методы локального повреждения почек, такие как тромбоэмболия, клипирование или перевязка отдельных почечных артериол, дозированная компрессия тканей применяются крайне редко.

В мозге широко используется фокальная ишемия, вызванная фототромбозом, которая имеет ряд преимуществ по сравнению с другими моделями инсульта. Во-первых, она обеспечивает предсказуемое и четко определенное место ишемического поражения [Uzdensky, 2018]. Во-вторых,

фототромбоза высоко воспроизводима, малоинвазивна и требует минимальных хирургических вмешательств, в том числе отсутствия механических манипуляций с кровеносными сосудами. Наконец, очевидным преимуществом этого метода является то, что повреждается только часть органа, с возможностью варьировать локализацию поражения вместо тотального повреждения.

Несмотря на минимальную инвазивность, хорошо отработанную процедуру и высокую воспроизводимость, модель фокальной ишемии, вызванной фототромбозом, все еще очень ограничено транслируется на другие органы, кроме мозга. Эта модель уже была успешно использована только на спинном мозге [Li и др., 2015b] или сетчатка [Ameri и др., 2008; Zhang и др., 2008]. В этих органах протокол был аналогичен стандартному фототромбозу мозга и состоял из введения фотоактивируемого красителя и воздействия источника света на интересующую зону.

В рамках данной работы мы продемонстрировали, что модель фототромбоза почек может быть использована для локального повреждения почек. Согласно окрашиванию ТТС, микро-КТ и гистологическим данным, фототромбоз вызывает небольшую зону инфаркта с воспроизводимым объемом, размер которого потенциально может регулироваться интенсивностью луча, продолжительностью светового воздействия и концентрацией Бенгальского розового [Galkov и др., 2020; Verma, Singhal, Anand, 2021]. В отличие от других животных моделей локального повреждения почек, реализация фототромбоза намного проще, поскольку не требует серьезных хирургических манипуляций с почечными кровеносными сосудами или паренхимой.

Микро-КТ, использованная в этой работе, оказалась эффективным методом визуализации области инфаркта после фототромбоза почки (Рис. 6). Микро-КТ-визуализация позволяет проводить высокоразрешающую

визуализацию ишемического поражения, сохраняя естественную архитектуру ткани. Более того, программные инструменты, используемые для дальнейшего анализа изображений, например, измерение объема и анализ насыщенности серого, могут быть ценными для дополнительной характеристики инфаркта (Рис. 6, 7). Для избежания артефактов ручной сегментации изображений, мы предлагаем использовать инструменты машинного обучения для более точной сегментации гетерогенных поражений со сложной геометрией в будущих исследованиях [Hussain и др., 2021; Ohnishi и др., 2021].

Ожидается, что патологические изменения при фототромбозе будут аналогичны тем, которые происходят при И/Р почки. Полная И/Р достигается путем пережатия почечной артерии, что приводит к лишению поступления кислорода и питательных веществ, ведущему к отеку канальцевых и клубочковых клеток, некрозу или апоптозу и расширению канальцев [Korkmaz, Kolankaya, 2010]. Действительно, на гистологическом уровне фототромбоз-индуцированное повреждение почек напоминало повреждение от И/Р. Подобно И/Р, фототромбоз вызвал гибель клеток в области инфаркта, что выражалось в виде клеток с отсутствием ядер и положительных на каспазу клеток внутри области инфаркта, а также негативному окрашиванию на ТТС. Повреждены были как канальцы, так и клубочки, что было четко показано с помощью микро-КТ с последующим гистологическим исследованием тех же участков. Единственным отличием между моделью фототромбоза и И/Р может быть отсутствие фазы реперфузии, однако в связи с этим мы не обнаружили существенных морфологических отличий.

Мы также обнаружили расширение канальцев и образование гиалиновых цилиндров, которые являются общими признаками дисфункции эпителия и десквамации при различных моделях повреждения почек, включая И/Р [Ashrafi и др., 2013; Uchino и др., 2017]. В нашей модели фототромбоза почек нефроны с гиалиновыми цилиндрами хорошо визуализировались как при гистологическом окрашивании ГЭ, так и при ШИК-реакции и с помощью

микро-КТ. Кроме того, каналы с гиалиновыми цилиндрами располагались по всему нефрону вплоть до мозгового вещества.

Ишемия почечной ткани и гибель канальцевых клеток обычно приводят к асептическому воспалению и лейкоцитарному инфильтрату [Linfert, Chowdhry, Rabb, 2009]. Активация иммунной системы играет двунаправленную роль в прогрессировании ишемического повреждения почек. После повреждения происходит индукция врожденных и адаптивных иммунных реакций, что приводит к развитию воспаления и дальнейшему повреждению тканей. В то же время показана роль иммунных клеток в восстановлении почечной ткани после повреждения, а именно в регенерации [Bonavia, Singbartl, 2018]. Действительно, в очаге фототромбоза и окружающей ткани мы обнаружили лейкоцитарную инфильтрацию, слабо проявляющуюся через 24 ч и 48 ч после фототромботического повреждения. Повышенная проницаемость сосудистой стенки, которая была обнаружена с помощью теста с Эвансом синим и окрашивания MSB на фибрин, может способствовать инфильтрации лейкоцитов [Kinsey, Li, Okusa, 2008]. Дезорганизация внеклеточного матрикса, наблюдаемая после фототромбоза, также может способствовать воспалению [Heinzelmann, Mercer-Jones, Passmore, 1999].

Мы предполагаем, что вызванная фототромбозом фокальная ишемия почек может быть полезной моделью для исследования механизмов регенерации почек. В настоящее время механизмы восстановления почек еще не выяснены, и до сих пор нет единого мнения, что отвечает за восстановление тканей: пролиферация прогениторных клеток или дедифференцировка эпителия канальцев [Kramann, Kusaba, Humphreys, 2015; Lombardi, Becherucci, Romagnani, 2015]. Отсутствие общепринятых маркеров, а также сложность морфологии почек затрудняют выяснение механизмов регенерации почек после повреждения [Andrianova и др., 2019]. Мы предполагаем, что фототромбоз почек может быть использован для оценки особенностей

регенерации почек, поскольку он вызывает локальное повреждение с четкой границей между поврежденной и здоровой тканью, что недостижимо при использовании традиционных моделей, таких как тотальная И/Р почки или нефротоксичность.

В данной работе проводилось двойное иммунофлуоресцентное окрашивание для оценки пролиферации (PCNA) и почечного повреждения (KIM-1). Фототромбоз вызвал значительное увеличение PCNA-положительных клеток через 48 ч после повреждения в зоне пенумбры, что указывает на репликацию и репарацию ДНК в этих клетках [Boehm, Gildenberg, Washington, 2016]. Большая часть клеток, экспрессирующих KIM-1, также были PCNA<sup>+</sup>, что говорит о колокализации поврежденных и регенерирующих клеток. Коэкспрессия маркеров повреждения и пролиферации может помочь выявить происхождение клеток, пролиферирующих после повреждения [Humphreys и др., 2011].

В связи с небольшим размером (1% объема почки), и сохранением функции контралатеральной почки, признаки ОПП после фототромбоз-индуцированной ишемии были не сильно выражены. Мы измерили уровни мочевины и креатинина в сыворотке, которые обычно используются для выявления ОПП в клинической практике, и обнаружили, что эти маркеры не были увеличены после фототромбоза. Поскольку данные маркеры повышаются только после значительной потери нефронов мы измерили уровень белка NGAL в моче, который является одним из наиболее чувствительных и ранних маркеров повреждения почек и повышается через несколько часов после повреждающего воздействия, достигая максимальных значений к 24 часам. Действительно, фототромбоз почек привел к повышению уровня NGAL в моче через 6 и 24 часа после травмы, снижаясь через 48 часов после индукции повреждения.

В связи с умеренностью развивающегося вследствие фототромбоза ОПП мы увеличили размер ишемического очага, используя источник света с большим диаметром пятна луча и сделали нефрэктомии контралатеральной почки. Используя более тяжелую модель, мы добились более выраженной ОПП, которое мы смогли диагностировать с помощью сывороточных (BUN, SCr) и уринарных (NGAL, KIM-1) маркеров. Таким образом, наша модель ишемии почки, вызванной фототромбозом, позволяет модулировать тяжесть и степень проявленности ОПП, например, за счет изменения размер очага повреждения или проведения контралатеральной нефрэктомии. Однако следует отметить, что использование более тяжелой модификации модели фототромбоза может быть связана с повышением инвазивности процедуры и сложности операции (в основном за счет контралатеральной нефрэктомии), а также летальности животных. Таким образом, исследователи должны подбирать такие условия модели фототромбоза, которые в наибольшей степени соответствуют цели конкретных экспериментов.

Другой типичной особенностью И/Р почки является замещение утраченных нефронов фиброзной тканью. Используя различные гистологические окраски, мы показали, что через 1 месяц после фототромбоза очаг повреждения был заполнен незрелыми коллагеновыми волокнами и отложениями кальция. В развитии фиброза после ОПП участвуют несколько типов клеток, включая проксимальные канальцевые клетки, фибробласты и иммунные клетки. Мы выявили наличие макрофагов, экспрессирующих CD163, непосредственно в очаге в фототромбоза окружающей ткани. M2-макрофаги, в том числе и CD163<sup>+</sup> играют важную роль в разрешении воспаления и предотвращении фиброза в почке. Макрофаги были обнаружены через 1 месяц после фототромботического повреждения, что свидетельствует о начале регенерации тканей и разрешении фиброза.

Таким образом, мы описали новую модель локального повреждения почек ишемическим воздействием, а также методы его обнаружения.

Предложенная модель отличается простотой процедуры, возможностью варьировать локализацию поражения, малой инвазивностью и риском сопутствующего повреждения. Благодаря малой инвазивности модели и относительно небольшому размеру образующегося поражения, страдания и чрезмерная гибель экспериментальных животных в значительной степени предотвращаются. Ишемия почек, вызванная фототромбозом, обеспечивает воспроизводимую область поражения с предсказуемым местоположением и разграничением между поврежденными и здоровыми тканями, что позволяет исследовать процессы повреждения, регенерации, воспаления и фиброза, происходящие там. Четкий контур поврежденной ткани позволяет легко получать образцы почечной ткани из поврежденных, периинфарктных и неповрежденных областей одной и той же почки для различных «омик»-исследований. Учитывая эти особенности почечного фототромбоза, мы предполагаем, что данная модель будет полезна для тестирования нефропротекторных препаратов и изучения механизмов почечной недостаточности и восстановления после травмы.

Кроме разработки новой экспериментальной модели, пробелы в понимании патогенеза ОПП может помочь исследование воспалительного ответа при ОПП, а также тестирование веществ, модулирующих воспалительный ответ [Andrianova, Zorov, Plotnikov, 2020]. Данный подход может не только выявить ключевые факторы в механизмах воспаления, вовлеченных в повреждение, но и помочь в поиске терапии ОПП. В данный момент разрабатываются различные препараты для лечения ОПП, которые могут подавлять чрезмерную воспалительную реакцию в ткани почек после повреждения. Существуют несколько потенциальных терапевтических подходов для лечения ОПП, направленных на компоненты воспалительных каскадов. Однако у существующих противовоспалительных стратегий есть серьезные ограничения. В частности, использование нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) может ухудшать течение

почечного повреждения. Данные препараты ингибируют COX-2, что приводит к снижению уровня простагландина E2 (PGE2) в почке [Jia и др., 2015]. В ответ на падение уровня PGE2 в почке снижается кровоток в афферентных артериолах клубочков, а также компенсаторно увеличивается уровень вазопрессина в крови, что в дальнейшем приводит к вазоконстрикции, которая еще больше ухудшает кровоснабжение почечной ткани и усугубляет ее повреждение [Ungprasert и др., 2015]. В связи с этим повсеместное использование классических НПВП не рекомендуется в случаях повреждения почек.

В этом контексте необходимо разрабатывать препараты, нацеленные на альтернативные патогенные пути воспалительного процесса при ОПП. Синаптамид (N-докозагексаенойлетаноламид), структурный аналог анадамида, эндогенного лиганда каннабиноидного рецептора, предложен в качестве перспективного терапевтического средства [Watson, Kim, Das, 2019]. В целом, показано, что эндоканнабиноиды омега-3 и омега-6 жирных кислот метаболизируются через пути, опосредованные липоксигеназой (LOX), ЦОГ и цитохромом-P450 (CYP450). Однако производное докозагексаеновой кислоты синаптамид, метаболизируется только через LOX и CYP450. Кроме того, предположительно противовоспалительное действие синаптамида может реализоваться за счет снижения ЦОГ-опосредованной продукции эйкозаноидов из арахидоновой кислоты, или может быть преобразован эйкозаноид-синтезирующими ферментами с образованием противовоспалительных липидных метаболитов [Meijerink и др., 2015].

Целью данного исследования было изучение эффектов синаптамида на воспаление при ОПП, вызванном И/Р почек, что ранее не исследовалось. Известно, что при ишемическом ОПП клетки иммунной системы активируются очень быстро в фазе реперфузии. Во время И/Р почек клетки врожденного иммунитета, такие как нейтрофилы, макрофаги, DC, NK-клетки и NKT-клетки, которые не являются антиген-специфическими, играют

ключевую роль в развитии воспаления. Нейтрофилы прикрепляются к активированному эндотелию и инфильтрируют в почку, что было продемонстрировано как в моделях животных, так и при ОПШ у человека, особенно в перитубулярной капиллярной сети наружного мозгового вещества, уже через 30 минут после реперфузии [Awad и др., 2006; Kelly и др., 1996; Solez, Morel-Maroger, Sraer, 1979; Watson, Kim, Das, 2019]. Показано, что количество макрофагов в почке увеличивается уже через 1 час после реперфузии, достигает пика через 24 часа и сохраняется в течение 7 дней [Li и др., 2008].

Ранее было показано, что синаптамид обладает широким спектром противовоспалительных, нейропротекторных и нейрогенных свойств, что делает его перспективным терапевтическим агентом для лечения различных неврологических заболеваний или повреждений мозга. Лечение синаптамидом при травме мозга или хроническом сдавливании седалищного нерва снижало астроглиоз и иммунную реактивность, а также уменьшало уровни воспалительных биомаркеров, таких как кислый глиальный фибриллярный белок (GFAP), S100 $\beta$  и IL-6 [Manzhulo и др., 2021; Ponomarenko и др., 2022; Starinets и др., 2022; Starinets, Tyrtysnaia, Manzhulo, 2023]. Кроме того, синаптамид предотвращал ЛПС-индуцированное увеличение продукции провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 в микроглие, выполняющей роль резидентных макрофагов в мозге [Park и др., 2016]. В рамках данной работы впервые было показано, что введение синаптамида привело к выраженному противовоспалительному эффекту при ишемическом ОПШ. Терапия синаптамидом при И/Р почек снижала экспрессию некоторых провоспалительных медиаторов, таких как IL-1 $\beta$  и TGF $\beta$ 1 (Рис. 17), что позволяет предположить, что синаптамид может модулировать определенные воспалительные пути.

Кроме того, мы обнаружили, что лечение синаптамидом вызвало повышение уровня противовоспалительного IL-10 в почечной ткани после И/Р

(Рис. 18). Это свидетельствует о том, что синаптамид может модулировать как провоспалительные, так и противовоспалительные факторы в почечном воспалительном ответе. Аналогичные тенденции наблюдались и для нервной ткани после повреждения. Например, введение синаптамида обращало повышение продукции IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  в гиппокампе, вызванное введением эндотоксина, и модулировало уровни провоспалительных (IL-1 $\beta$ , IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов в сыворотке и спинном мозге после сдавления нерва [Park и др., 2016; Starinets и др., 2023].

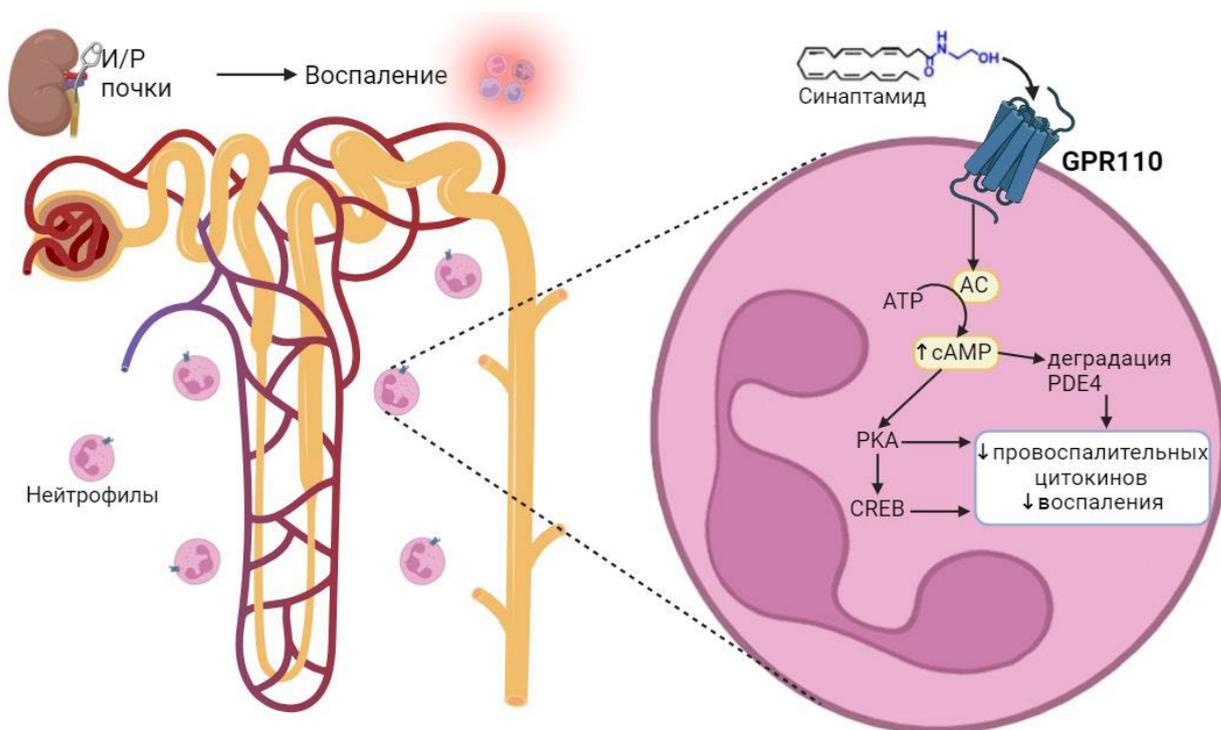
В нашем исследовании мы изучали инфильтрацию различных популяций лейкоцитов в почечную ткань после И/Р и показали, что наиболее активным было привлечение нейтрофилов, что подтверждается многократным увеличением экспрессии CXCL1 (Рис. 19с). Мы также количественно оценили количество нейтрофилов при гистологическом окрашивании срезов почек и обнаружили значительное увеличение этих иммунных клеток после И/Р, что частично ослаблялось введением синаптамида во время И/Р (Рис. 20). Содержание макрофагов, оцененное по экспрессии CD68, также увеличилось через 48 часов после И/Р почек (Рис. 19d). Стоит отметить, что введение синаптамида снижало уровень лейкоцитарного интегрина CD11a, который был повышен после И/Р. Ранее терапия с использованием анти-CD11a показала благотворное влияние на функцию почек после И/Р и привела к уменьшению некроза канальцев и снижению инфильтрации лейкоцитов после повреждения [Tajra и др., 1999].

Недавние исследования показали, что синаптамид модулирует представленность различных типов макрофагов. Во время повреждения нерва синаптамид увеличивал количество CD163<sup>+</sup> клеток (противовоспалительные макрофаги), и снижал количество CD68<sup>+</sup> клеток, что указывало на уменьшение числа провоспалительных M1 макрофагов [Starinets, Tyrtysnaia, Manzhulo, 2023]. Аналогичным образом, синаптамид демонстрировал противовоспалительные эффекты, снижая экспрессию провоспалительных

маркеров (CD86 и MHC II) и способствуя продукции противовоспалительных маркеров (Arg1 и CD206), а также подавляя активность Iba-1<sup>+</sup>-макрофагов [Park и др., 2016]. Синаптамид продемонстрировал способность увеличивать синтез CD206 в культуре макрофагов после LPS-индуцированного воспаления [Starinets и др., 2023]. В нашем исследовании, хотя общее количество макрофагов не изменилось под воздействием синаптамида, терапия значительно снизила содержание CD86<sup>+</sup>-клеток (предположительно M1 макрофагов) и увеличила количество CD163<sup>+</sup>-клеток (M2 макрофагов), что свидетельствует о модуляции поляризации макрофагов.

Чтобы лучше понять молекулярные механизмы действия синаптамида, мы изучили роль GPR110, который был предложен как его рецептор [Huang и др., 2020; Starinets и др., 2023]. Мы предполагаем, что сигнальные пути через этот рецептор вовлечены в противовоспалительное действие синаптамида при ОПП. Действительно, мы обнаружили значительное увеличение экспрессии GPR110 в почечной ткани крыс, получавших лечение синаптамидом, что указывает на возможное участие GPR110 в реализации эффектов синаптамида при почечном ОПП. Интересно, что экспрессия этого рецептора не увеличивалась у интактных животных, получавших синаптамид. Чтобы идентифицировать конкретные клеточные популяции, ответственные за повышенную экспрессию GPR110, мы изолировали CD11b/c<sup>+</sup>-клетки, которые в основном представлены нейтрофилами и макрофагами [Spitzer, Zhang, 1996]. Действительно, CD11b/c<sup>+</sup>-клетки из почек крыс, подвергшихся И/Р и лечению синаптамидом, демонстрировали повышенную экспрессию GPR110. Более того, CD11b/c<sup>+</sup>-клетки показали снижение экспрессии провоспалительных маркеров, таких как TNF-α и IL-1β, после введения синаптамида. В то же время мы обнаружили, что GPR110 не экспрессировался в PBMCs, которые в основном представлены лимфоцитами и моноцитами, как у интактных крыс, так и у тех, кто подвергся И/Р, и что синаптамид не влиял на экспрессию провоспалительных цитокинов в этих клетках [Farina и др., 2023]. Эти результаты позволяют предположить, что противовоспалительный эффект

синаптамида, вероятно, реализуется через пути, опосредованные GPR110, в нейтрофилах, что впервые было продемонстрировано в контексте ОПП в рамках данного диссертационного исследования (рис. 36).



**Рис. 36.** Возможные механизмы снижения воспаления, опосредованного синаптамидом/GPR110, при ОПП, вызванном И/Р. AC — аденилатциклаза, АТФ — аденозинтрифосфат, сАМР — циклический аденозинмонофосфат, CREB — белок, связывающий элемент ответа на сАМР, GPR110 — рецептор, связанный с G-белком 110, И/Р — ишемия/реперфузия, PKA — протеинкиназа A, PDE4 — фосфодиэстераза-4.

Несмотря на продемонстрированный противовоспалительный эффект синаптамида на фоне ишемически-реперфузионного повреждения, препарат улучшал функцию почек при выбранных дозах и длительности лечения (Рис. 23). Это может быть связано с тем, что патофизиология ОПП включает в себя сложные клеточные и молекулярные сигнальные пути, включающие воспаление, окислительный стресс, апоптоз и микрососудистую дисфункцию [Maremonti, Meyer, Linkermann, 2022]. Может потребоваться модификация

протокола терапии синаптамидом для достижения снижения тяжести ишемического повреждения почек.

В связи с тем, что воспаление является одним из ключевых патологических механизмов в развитии ОПП разного генеза, а развитие сепсиса, которому подвержены новорожденные, часто влечет за собой развитие дисфункции почек, мы оценили тяжесть ОПП при анализе клинических данных пациентов хирургических отделений, а также провели моделирование системного воспаления у новорожденных крыс, сопряженное с терапией антибиотиками. Сепсис - это сложный клинический синдром, связанный с тяжелым системным воспалением и последующим повреждением многих органов, провоцирующим полиорганную недостаточность [Rossaint, Zarbock, 2015]. Сепсис считается одной из основных причин ОПП у новорожденных в хирургических отделениях и отделениях интенсивной терапии [Cleto-Yamane и др., 2019]. Это патологическое состояние может осложняться применением массивной фармакотерапии, включающую антибактериальную. Несмотря на необходимость лечения антибиотиками при сепсисе, эти препараты могут усугубить повреждение почек из-за возможной нефротоксичности [Wargo, Edwards, 2014]. Поэтому целью данного исследования было оценить влияние различных антибиотиков на тяжесть ОПП у новорожденных с признаками сепсиса или без них. Модель системного воспаления на животных была также использована для подтверждения данных, полученных на новорожденных, и для доказательства действия аминогликозидного антибиотика гентамицина, который является одним из наиболее часто назначаемых препаратов для лечения бактериальных инфекций у детей и нефротоксичность которого хорошо документирована [Turner и др., 2009].

При изучении ЛПС-индуцированного воспаления у новорожденных крыс мы зафиксировали тенденцию к ослаблению ОПП, которая проявляется в снижении уровней некоторых маркеров после применения антибиотиков

гентамицина и ванкомицина на фоне эндотоксина, по сравнению с действием чистого ЛПС. Такое снижение может быть объяснено иммуномодулирующими эффектами антибиотиков, не связанными с их прямым антибактериальным действием, свидетельства чему имеются в литературе. Известно, что ЛПС через специфический рецептор TLR4 запускает иммунный ответ, который характеризуется выработкой провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ . Кроме того, ЛПС-активация изменяет экспрессию разных рецепторов TLR в иммунных клетках, отвечающих на воздействие других PAMPs, что может привести впоследствии к чрезмерной воспалительной реакции и развитию состояния острого повреждения почек и других органов.

Обнаруженное нами улучшение показателей ОПП после применения антибиотиков на фоне ЛПС может быть связано с показанным ранее иммуномодулирующим действием гентамицина и ванкомицина на продукцию цитокинов при грамотрицательном сепсисе за счет снижения экспрессии IL-1 $\beta$  и IL-6, а также самого TLR4, через который действует ЛПС. Для гентамицина продемонстрировано подавление эндотоксин-индуцированной продукции TNF $\alpha$ , в клетках проксимальных канальцев после их стимуляции ЛПС *in vitro*, предположительно за счет ингибирования трансляции. Эти результаты свидетельствуют о том, что антибиотики могут изменять реакцию иммунных клеток на ЛПС. Модуляция иммунного ответа через TLRs является перспективной стратегией в лечении сепсиса. Известно, что системное воспаление играет значительную роль в развитии ЛПС-индуцированного ОПП. Противовоспалительное действие рассматриваемых антибиотиков может облегчить развитие данного последствия септического поражения, помимо их прямого действия на элиминацию патогенных микроорганизмов.

Тем не менее, основные молекулярные и клеточные механизмы действия антибиотиков на экспрессию разных TLR и ассоциированных с сепсисом цитокинов, остаются неясными, что вызывает необходимость проводить

дальнейшие исследования иммуномодулирующих свойств антибиотиков при развитии сепсиса.

В рамках данной работы также было проанализировано действие 12 антибиотиков, которые получали пациенты отделения неотложной хирургии новорожденных Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии. Антибактериальная терапия включала препараты из групп пенициллинов (амоксициллин в комбинации с клавулановой кислотой и ампициллином), аминогликозидов (гентамицин, нетилмицин, амикацин), цефалоспоринов (цефепим, цефоперазон в комбинации с сульбактамом), карбапенемов (меропенем и имипенем в комбинации с циластатином), а также гликопептидов (ванкомицин), оксазолидинон (линезолид) и нитроимидазол (метронидазол). Основным результатом нашего исследования стало то, что терапия ампициллином в комбинации с сульбактамом и метронидазолом уменьшила признаки ОПП у новорожденных с признаками сепсиса, в то время как у получавших, цефепим, линезолид или имипенем в комбинации с циластатином, мы обнаружили увеличение тяжести ОПП, оцененное по уровню мочевины (рис. 34, 35).

Ранее сообщалось о возможных нефротоксических эффектах некоторых антибиотиков у новорожденных. Нефротоксичность является одним из наиболее распространенных побочных эффектов аминогликозидных антибиотиков [Lopez-Novoа и др., 2011]. Недавние эпидемиологические исследования показали, что ОПП может развиваться примерно у 20-33% детей, получающих аминогликозиды [McWilliam и др., 2017]. Например, неправильное применение гентамицина с многократными дозировками может привести к повышению креатинина у недоношенных новорожденных [McWilliam и др., 2017].

В мировой клинической практике функцию почек рекомендуется оценивать по динамике концентраций SCr и BUN в крови [Khwaја, 2012]. Поскольку физиология почек у детей, особенно новорожденных, отличается

от физиологии почек взрослых, для таких пациентов были созданы педиатрические шкалы pRIFLE и nRIFLE [Ricci, Ronco, 2013]. Однако чувствительность общепринятых маркеров и скорость их изменения не соответствуют современным требованиям диагностики ОПП [Wen, Parikh, 2021]. Например, было убедительно доказано, что креатинин не эффективен в диагностике ОПП при некоторых неонатальных состояниях [Ricci, Ronco, 2013; Yamate и др., 2005]. В данной работе мы обнаружили, что концентрация С-реактивного белка не коррелирует с уровнем креатинина в сыворотке, в отличие от уровня мочевины (рис. 33), что подтверждает тот факт, что креатинин не может служить хорошим маркером ОПП у новорожденных, в том числе с сепсисом.

## 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная диссертационная работа посвящена развитию ОПП, распространенного патологического состояния, которое встречается как у взрослых, так и у новорожденных пациентов, а также поиску потенциальных подходов к нефропротекции. В связи с тем, что к развитию ОПП приводят различные причины, наиболее частыми из которых являются ишемически-реперфузионное повреждение и системное воспаление, исследование проводилось с использованием различных экспериментальных моделей. Так как заболеваниями почек страдают и взрослые, и новорожденные пациенты в работе использовались животные разных возрастных групп. На взрослых животных исследовали действие потенциального защитного вещества синаптамида при моделировании ОПП в классической модели И/Р почки, а также впервые представили новый экспериментальный подход к моделированию повреждения почки, а именно фототромбоз-индуцированную локальную ишемию почки. Так как новорожденные пациенты наиболее подвержены развитию сепсиса и такого осложнения как ОПП, мы провели анализ клинических данных хирургических пациентов неонатального отделения, принимавших антибиотики, а также оценили влияние лечения гентамицином при моделировании системного воспаления на новорожденных крысах.

Таким образом, в рамках данной диссертационной работы была описана новая модель локального ишемического повреждения почек, а также приведена характеристика развивающегося поражения с использованием различных экспериментальных подходов. Предложенная модель отличается простотой процедуры и возможностью варьировать локализацию поражения. Благодаря низкой инвазивности подхода и относительно небольшому размеру возникающего в результате поражения очага, в значительной степени предотвращается чрезмерная гибель экспериментальных животных, которая может встречаться в хирургически сложных моделях. Ишемия почек,

вызванная фототромбозом, позволяет получить воспроизводимую область повреждения с предсказуемым расположением и разграничением между поврежденными и здоровыми тканями, что позволяет исследовать процессы регенерации, воспаления и фиброза, происходящие в этой зоне. При фототромбозе почки было выявлено выраженное нарушение морфологии почечной ткани, изменение проницаемости сосудов, гибель почечных клеток в острой фазе, индукция апоптоза, повышение пролиферации на границе поврежденной и здоровой ткани, а также отложение коллагеновых волокон и привлечение противовоспалительных макрофагов в отдаленный период. Учитывая эти особенности фототромбоза почек, мы предполагаем, что данная модель будет полезна для тестирования нефропротекторных препаратов и изучения механизмов почечной недостаточности и восстановления после повреждения.

Противовоспалительный эффект синаптамида, структурного аналога эндогенного лиганда каннабиноидного рецептора анандамида, впервые был продемонстрирован на модели ишемически-реперфузионного ОПП. Показано, что лечение синаптамидом снижало уровни провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TGF $\beta$ 1 в почечной ткани после повреждения, что было связано со снижением их экспрессии в иммунных клетках, инфильтрирующих почечную ткань. На основании полученных данных мы предполагаем, что наблюдаемые противовоспалительные эффекты реализуются через рецептор GPR110 на нейтрофилах. Однако, несмотря на выраженный противовоспалительный эффект, лечение синаптамидом не привело к улучшению функции почек. Эти результаты могут быть обусловлены множеством механизмов развития ОПП, которые одновременно запускают воспаление, окислительный стресс, апоптоз и микрососудистую дисфункцию, в то время как синаптамид не влияет на все эти процессы. Мы надеемся, что синаптамид или его производные могут быть использованы в терапии ОПП или других заболеваний.

Кроме того, было проанализировано влияние антибактериальной терапии на развитие ОПП у новорожденных с признаками сепсиса. Нашей целью было проверить гипотезу о том, может ли лечение антибиотиками вызвать или усугубить ОПП при неонатальном сепсисе. Однако мы выявили, что терапия амоксициллином в комбинации с клавулановой кислотой или гентамицином оказывала довольно благоприятное влияние на функцию почек и снижала маркеры ОПП в общей группе пациентов, а ампициллин в комбинации с сульбактамом или метронидазолом улучшал функцию почек у пациентов с подозрением на сепсис. Аналогичным образом, лечение неонатальных крыс гентамицином улучшало функцию почек при ОПП, вызванного ЛПС.

Таким образом, данная диссертационная работа представляет собой комплексное исследование механизмов ОПП как у взрослых, так и у новорожденных. Описанная новая экспериментальная модель почечного повреждения открывает новые возможности изучения данной патологии. Применение синаптамида обладало выраженным противовоспалительным действием при ишемически-реперфузионном повреждении, что не привело к снижению тяжести ОПП. Анализ влияния антибактериальной терапии на почечную функцию у новорожденных пациентов с сепсисом показал потенциальную безопасность применения некоторых антибиотиков, что имеет важное клиническое значение.

## 7. ВЫВОДЫ

1. Локальная ишемия почки в результате фотоиндуцированного тромбоза сосудов приводит к формированию очага повреждения, с выраженным нарушением морфологии почечной ткани, изменением проницаемости сосудов, гибелью почечных клеток в острой фазе, а также отложением коллагеновых волокон и привлечением противовоспалительных макрофагов в отдаленный период.

2. Ишемически-реперфузионное повреждение почки приводит к инфильтрации иммунных клеток в ткань почки, основными популяциями среди которых являются CD11a-, CD68- и CXCL1-положительные клетки, а также повышению в ткани почки маркеров воспаления, таких как TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-1 $\beta$ .

3. Введение синаптамида приводит к выраженному противовоспалительному эффекту, и реализуется предположительно через рецептор GPR110 на нейтрофилах, однако не снижает тяжесть ОПП.

4. ЛПС-индуцированное системное воспаление у новорожденных крыс приводило к развитию ОПП, выражающемуся в повышении уровня мочевины в сыворотке и NGAL в моче, а признаки сепсиса у новорожденных пациентов в клинике были ассоциированы усугублением тяжести ОПП, оцененному по уровню мочевины.

5. Определены антибиотики, положительно влияющие на функцию почек при системном воспалении, в частности, гентамицин снижал тяжесть ЛПС-индуцированного ОПП у новорожденных крыс, а ампициллин в комбинации с сульбактамом или метронидазол снижал маркеры ОПП у пациентов с подозрением на сепсис.

## 8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aderem A., Ulevitch R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response // *Nature*. 2000. Т. 406. № 6797. С. 782–787.
2. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity // *Cell*. 2006. Т. 124. № 4. С. 783–801.
3. Aksu U., Demirci C., Ince C. The pathogenesis of acute kidney injury and the toxic triangle of oxygen, reactive oxygen species and nitric oxide // *Contributions to nephrology*. 2011. Т. 174. С. 119–128.
4. Alejandro V., Scandling J.D. Jr, Sibley R.K., Dafoe D., Alfrey E., Deen W., Myers B.D. Mechanisms of filtration failure during postischemic injury of the human kidney. A study of the reperfused renal allograft // *The Journal of clinical investigation*. 1995. Т. 95. № 2. С. 820–831.
5. Ameri H., Ratanapakorn T., Rao N.A., Chader G.J., Humayun M.S. Natural course of experimental retinal vein occlusion in rabbit; arterial occlusion following venous photothrombosis // *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2008. Т. 246. № 10. С. 1429–1439.
6. Anders H.-J., Schaefer L. Beyond tissue injury-damage-associated molecular patterns, toll-like receptors, and inflammasomes also drive regeneration and fibrosis // *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2014. Т. 25. № 7. С. 1387–1400.
7. Andrianova N.V., Buyan M.I., Zorova L.D., Pevzner I.B., Popkov V.A., Babenko V.A., Silachev D.N., Plotnikov E.Y., Zorov D.B. Kidney Cells Regeneration: Dedifferentiation of Tubular Epithelium, Resident Stem Cells and Possible Niches for Renal Progenitors // *International journal of molecular sciences*. 2019. Т. 20. № 24.
8. Andrianova N.V., Zorov D.B., Plotnikov E.Y. Targeting Inflammation and Oxidative Stress as a Therapy for Ischemic Kidney Injury // *Biochemistry. Biokhimiia*. 2020. Т. 85. № 12. С. 1591–1602.
9. Ashburn T.T., Thor K.B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs // *Nature reviews. Drug discovery*. 2004. Т. 3. № 8. С. 673–683.
10. Ash C., Dubec M., Donne K., Bashford T. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods // *Lasers in medical science*. 2017. Т. 32. № 8. С. 1909–1918.

11. Ashrafi F., Nematbakhsh M., Nasri H., Talebi A., Hosseini S.M., Ashrafi M. Vacuolization, dilatation, hyaline cast, debris or degeneration: which one is the most correlated item to score the kidney damage pathologically in Cisplatin induced nephrotoxicity model? // *Nephro-urology monthly*. 2013. T. 5. № 4. C. 918–920.
12. Ashworth S.L., Sandoval R.M., Hosford M., Bamburg J.R., Molitoris B.A. Ischemic injury induces ADF relocalization to the apical domain of rat proximal tubule cells // *American journal of physiology. Renal physiology*. 2001. T. 280. № 5. C. F886–94.
13. Ashworth S.L., Sandoval R.M., Tanner G.A., Molitoris B.A. Two-photon microscopy: visualization of kidney dynamics // *Kidney international*. 2007. T. 72. № 4. C. 416–421.
14. Ashworth S.L., Southgate E.L., Sandoval R.M., Meberg P.J., Bamburg J.R., Molitoris B.A. ADF/cofilin mediates actin cytoskeletal alterations in LLC-PK cells during ATP depletion // *American journal of physiology. Renal physiology*. 2003. T. 284. № 4. C. F852–62.
15. Ashworth S.L., Wean S.E., Campos S.B., Temm-Grove C.J., Southgate E.L., Vrhovski B., Gunning P., Weinberger R.P., Molitoris B.A. Renal ischemia induces tropomyosin dissociation-destabilizing microvilli microfilaments // *American journal of physiology. Renal physiology*. 2004. T. 286. № 5. C. F988–96.
16. Atkinson S.J., Hosford M.A., Molitoris B.A. Mechanism of actin polymerization in cellular ATP depletion // *The Journal of biological chemistry*. 2004. T. 279. № 7. C. 5194–5199.
17. Awad A.S., Ye H., Huang L., Li L., Foss F.W. Jr, Macdonald T.L., Lynch K.R., Okusa M.D. Selective sphingosine 1-phosphate 1 receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in mouse kidney // *American journal of physiology. Renal physiology*. 2006. T. 290. № 6. C. F1516–24.
18. Basile D.P. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function // *Kidney international*. 2007. T. 72. № 2. C. 151–156.
19. Bayir H. Reactive oxygen species // *Critical care medicine*. 2005. T. 33. № 12 Suppl. C. S498–501.
20. Bellomo R., Ronco C., Kellum J.A., Mehta R.L., Palevsky P. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group // *Critical care*. 2004. T. 8. № 4. C. 1–9.

21. Benedek A., Móricz K., Jurányi Z., Gigler G., Lévy G., Hársing L.G. Jr, Mátyus P., Szénási G., Albert M. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats // *Brain research*. 2006. T. 1116. № 1. C. 159–165.
22. Berger A., Crozier G., Bisogno T., Cavaliere P., Innis S., Di Marzo V. Anandamide and diet: inclusion of dietary arachidonate and docosahexaenoate leads to increased brain levels of the corresponding N-acyl ethanolamines in piglets // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001. T. 98. № 11. C. 6402–6406.
23. Bisogno T., Delton-Vandenbroucke I., Milone A., Lagarde M., Di Marzo V. Biosynthesis and inactivation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) and N-docosahexaenylethanolamine in bovine retina // *Archives of biochemistry and biophysics*. 1999. T. 370. № 2. C. 300–307.
24. Blantz R.C., Deng A., Miracle C.M., Thomson S.C. Regulation of kidney function and metabolism: a question of supply and demand // *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2007. T. 118. C. 23–43.
25. Boehm E.M., Gildenberg M.S., Washington M.T. The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication // *The Enzymes*. 2016. T. 39. C. 231–254.
26. Bolisetty S., Agarwal A. Neutrophils in acute kidney injury: not neutral any more // *Kidney international*. 2009. T. 75. № 7. C. 674–676.
27. Bonavia A., Singbartl K. A review of the role of immune cells in acute kidney injury // *Pediatric nephrology* . 2018. T. 33. № 10. C. 1629–1639.
28. Bonventre J.V. Kidney ischemic preconditioning // *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2002. T. 11. № 1. C. 43–48.
29. Bonventre J.V. Pathophysiology of acute kidney injury // *Nephrology rounds*. 2008.
30. Bonventre J.V. Pathophysiology of AKI: injury and normal and abnormal repair // *Contributions to nephrology*. 2010. T. 165. C. 9–17.
31. Bonventre J.V., Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury // *The Journal of clinical investigation*. 2011. T. 121. № 11. C. 4210–4221.
32. Bonventre J.V., Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? // *Kidney international*. 2004. T. 66. № 2. C. 480–485.
33. Bordoni L., Kristensen A.M., Sardella D., Kidmose H., Pohl L., Krag S.R.P., Schiessl I.M. Longitudinal tracking of acute kidney injury reveals injury

propagation along the nephron // *Nature communications*. 2023. T. 14. № 1. C. 4407.

34. Bragadottir G., Redfors B., Ricksten S.-E. Mannitol increases renal blood flow and maintains filtration fraction and oxygenation in postoperative acute kidney injury: a prospective interventional study // *Critical care / the Society of Critical Care Medicine*. 2012. T. 16. № 4. C. R159.

35. Brealey D., Karyampudi S., Jacques T.S., Novelli M., Stidwill R., Taylor V., Smolenski R.T., Singer M. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure // *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2004. T. 286. № 3. C. R491–7.

36. Brezgunova A.A., Andrianova N.V., Popkov V.A., Tkachev S.Y., Manskikh V.N., Pevzner I.B., Zorova L.D., Timashev P.S., Silachev D.N., Zorov D.B., Plotnikov E.Y. New experimental model of kidney injury: Photothrombosis-induced kidney ischemia // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2023. T. 1869. № 3. C. 166622.

37. Brooks D.P. Role of endothelin in renal function and dysfunction // *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 1996. T. 23. № 4. C. 345–348.

38. Cai X., Zhang C.-J., Lim F.T.W., Chan S.J., Bandla A., Chuan C.K., Hu F., Xu S., Thakor N.V., Liao L.-D., Liu B. Organic Nanoparticles with Aggregation-Induced Emission for Bone Marrow Stromal Cell Tracking in a Rat PTI Model // *Small*. 2016. T. 12. № 47. C. 6576–6585.

39. Chen G.Y., Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage // *Nature reviews. Immunology*. 2010. T. 10. № 12. C. 826–837.

40. Chen H., Yoshioka H., Kim G.S., Jung J.E., Okami N., Sakata H., Maier C.M., Narasimhan P., Goeders C.E., Chan P.H. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection // *Antioxidants & redox signaling*. 2011. T. 14. № 8. C. 1505–1517.

41. Chen J., Doctor R.B., Mandel L.J. Cytoskeletal dissociation of ezrin during renal anoxia: role in microvillar injury // *The American journal of physiology*. 1994. T. 267. № 3 Pt 1. C. C784–95.

42. Chvojka J., Sýkora R., Karvunidis T., Raděj J., Kroužecký A., Novák I., Matějovič M. New developments in septic acute kidney injury // *Physiological research*. 2010. T. 59. № 6. C. 859–869.

43. Clanton T.L. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle // *Journal of applied physiology*. 2007. T. 102. № 6. C. 2379–2388.

44. Cleto-Yamane T.L., Gomes C.L.R., Suassuna J.H.R., Nogueira P.K. Acute Kidney Injury Epidemiology in pediatrics // *Jornal brasileiro de nefrologia: 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia*. 2019. T. 41. № 2. C. 275–283.
45. Collard C.D., Gelman S. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury // *Anesthesiology*. 2001. T. 94. № 6. C. 1133–1138.
46. Conger J. Hemodynamic factors in acute renal failure // *Advances in renal replacement therapy*. 1997. T. 4. № 2 Suppl 1. C. 25–37.
47. Cooper C.E., Giulivi C. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption II: Molecular mechanism and tissue physiology // *American journal of physiology. Cell physiology*. 2007. T. 292. № 6. C. C1993–2003.
48. Cortes A.L., Gonzalez S.R., Rioja L.S., Oliveira S.S.C., Santos A.L.S., Prieto M.C., Melo P.A., Lara L.S. Protective outcomes of low-dose doxycycline on renal function of Wistar rats subjected to acute ischemia/reperfusion injury // *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Basis of Disease*. 2018. T. 1864. № 1. C. 102–114.
49. Crowley L.E., McIntyre C.W. Remote ischaemic conditioning-therapeutic opportunities in renal medicine // *Nature reviews. Nephrology*. 2013. T. 9. № 12. C. 739–746.
50. Deckers J.G., De Haij S., Woude F.J. van der, Kooij S.W. van der, Daha M.R., Kooten C. van. IL-4 and IL-13 augment cytokine- and CD40-induced RANTES production by human renal tubular epithelial cells in vitro // *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 1998. T. 9. № 7. C. 1187–1193.
51. Deng J., Kohda Y., Chiao H., Wang Y., Hu X., Hewitt S.M., Miyaji T., McLeroy P., Nibhanupudy B., Li S., Star R.A. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury // *Kidney international*. 2001. T. 60. № 6. C. 2118–2128.
52. Dennis J.M., Witting P.K. Protective Role for Antioxidants in Acute Kidney Disease // *Nutrients*. 2017. T. 9. № 7.
53. Dirnagl U., Simon R.P., Hallenbeck J.M. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection // *Trends in neurosciences*. 2003. T. 26. № 5. C. 248–254.
54. Duann P., Lianos E.A., Ma J., Lin P.-H. Autophagy, Innate Immunity and Tissue Repair in Acute Kidney Injury // *International journal of molecular sciences*. 2016. T. 17. № 5. C. 662.
55. El-Achkar T.M., Hosein M., Dagher P.C. Pathways of renal injury in systemic

gram-negative sepsis // *European journal of clinical investigation*. 2008. T. 38 Suppl 2. № 2. C. 39–44.

56. Er F., Nia A.M., Dopp H., Hellmich M., Dahlem K.M., Caglayan E., Kubacki T., Benzing T., Erdmann E., Burst V., Gassanov N. Ischemic preconditioning for prevention of contrast medium-induced nephropathy: randomized pilot RenPro Trial (Renal Protection Trial) // *Circulation*. 2012. T. 126. № 3. C. 296–303.

57. Evans R.G., Gardiner B.S., Smith D.W., O'Connor P.M. Intrarenal oxygenation: unique challenges and the biophysical basis of homeostasis // *American journal of physiology. Renal physiology*. 2008. T. 295. № 5. C. F1259–70.

58. Farina F., Laezza M., Fasano A., Del Pozzo G. In vitro differentiation of macrophages from peripheral blood cells of celiac patients // *Methods in cell biology*. 2023. T. 179. C. 103–112.

59. Friederich-Persson M., Persson P., Hansell P., Palm F. Deletion of Uncoupling Protein-2 reduces renal mitochondrial leak respiration, intrarenal hypoxia and proteinuria in a mouse model of type 1 diabetes // *Acta physiologica*. 2018. T. 223. № 4. C. e13058.

60. Fu Y., Tang C., Cai J., Chen G., Zhang D., Dong Z. Rodent models of AKI-CKD transition // *American journal of physiology. Renal physiology*. 2018. T. 315. № 4. C. F1098–F1106.

61. Galkov M., Gulyaev M., Kiseleva E., Andreev-Andrievskiy A., Gorbacheva L. Methods for detection of brain injury after photothrombosis-induced ischemia in mice: Characteristics and new aspects of their application // *Journal of neuroscience methods*. 2020. T. 329. C. 108457.

62. Gillies M.A., Kakar V., Parker R.J., Honoré P.M., Ostermann M. Fenoldopam to prevent acute kidney injury after major surgery-a systematic review and meta-analysis // *Critical care / the Society of Critical Care Medicine*. 2015. T. 19. C. 449.

63. Gomez H., Ince C., De Backer D., Pickkers P., Payen D., Hotchkiss J., Kellum J.A. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury // *Shock (Augusta, Ga.)*. 2014. T. 41. № 1. C. 3–11.

64. Gonsalez S.R., Cortês A.L., Silva R.C. da, Lowe J., Prieto M.C., Silva Lara L. da. Acute kidney injury overview: From basic findings to new prevention and therapy strategies // *Pharmacology & therapeutics*. 2019. T. 200. C. 1–12.

65. Gunaydin G., Gedik M.E., Ayan S. Photodynamic Therapy-Current

Limitations and Novel Approaches // *Frontiers in chemistry*. 2021. T. 9. C. 691697.

66. Hayashi T., Saito A., Okuno S., Ferrand-Drake M., Dodd R.L., Chan P.H. Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons // *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2005. T. 25. № 1. C. 41–53.

67. Heinzelmann M., Mercer-Jones M.A., Passmore J.C. Neutrophils and renal failure // *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*. 1999. T. 34. № 2. C. 384–399.

68. Hertzberg D., Rydén L., Pickering J.W., Sartipy U., Holzmann M.J. Acute kidney injury—an overview of diagnostic methods and clinical management // *Clinical kidney journal*. 2017. T. 10. № 3. C. 323–331.

69. Hertz L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective // *Neuropharmacology*. 2008. T. 55. № 3. C. 289–309.

70. Hosseini S.M., Gholami Pourbadie H., Naderi N., Sayyah M., Zibaii M.I. Photothrombotically induced unilateral selective hippocampal ischemia in rat // *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2018. T. 94. № Pt 1. C. 77–86.

71. Huang B.X., Hu X., Kwon H.-S., Fu C., Lee J.-W., Southall N., Marugan J., Kim H.-Y. Synaptamide activates the adhesion GPCR GPR110 (ADGRF1) through GAIN domain binding // *Communications biology*. 2020. T. 3. № 1. C. 109.

72. Hukriede N.A., Soranno D.E., Sander V., Perreau T., Starr M.C., Yuen P.S.T., Siskind L.J., Hutchens M.P., Davidson A.J., Burmeister D.M., Faubel S., Caestecker M.P. de. Experimental models of acute kidney injury for translational research // *Nature reviews. Nephrology*. 2022. T. 18. № 5. C. 277–293.

73. Humphreys B.D., Czerniak S., DiRocco D.P., Hasnain W., Cheema R., Bonventre J.V. Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011. T. 108. № 22. C. 9226–9231.

74. Hussain R., Lalande A., Girum K.B., Guigou C., Bozorg Grayeli A. Automatic segmentation of inner ear on CT-scan using auto-context convolutional neural network // *Scientific reports*. 2021. T. 11. № 1. C. 4406.

75. Ihtiyar E., Yaşar N.F., Erkasap N., Köken T., Tosun M., Oner S., Erkasap S. Effects of doxycycline on renal ischemia reperfusion injury induced by abdominal

compartment syndrome // The Journal of surgical research. 2011. T. 167. № 1. C. 113–120.

76. Jang H.R., Ko G.J., Wasowska B.A., Rabb H. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney // Journal of molecular medicine . 2009. T. 87. № 9. C. 859–864.

77. Jankauskas S.S., Andrianova N.V., Alieva I.B., Prusov A.N., Matsievsky D.D., Zorova L.D., Pevzner I.B., Savchenko E.S., Pirogov Y.A., Silachev D.N., Plotnikov E.Y., Zorov D.B. Dysfunction of Kidney Endothelium after Ischemia/Reperfusion and Its Prevention by Mitochondria-Targeted Antioxidant // Biochemistry. Biokhimiia. 2016. T. 81. № 12. C. 1538–1548.

78. Jankauskas S.S., Plotnikov E.Y., Morosanova M.A., Pevzner I.B., Zorova L.D., Skulachev V.P., Zorov D.B. Mitochondria-targeted antioxidant SkQR1 ameliorates gentamycin-induced renal failure and hearing loss // Biochemistry. Biokhimiia. 2012. T. 77. № 6. C. 666–670.

79. Jean-Baptiste E. Cellular mechanisms in sepsis // Journal of intensive care medicine. 2007. T. 22. № 2. C. 63–72.

80. Jia Z., Zhang Y., Ding G., Heiney K.M., Huang S., Zhang A. Role of COX-2/mPGES-1/prostaglandin E2 cascade in kidney injury // Mediators of inflammation. 2015. T. 2015. C. 147894.

81. Joannidis M., Druml W., Forni L.G., Groeneveld A.B.J., Honore P.M., Hoste E., Ostermann M., Oudemans-van Straaten H.M., Schetz M. Prevention of acute kidney injury and protection of renal function in the intensive care unit: update 2017 : Expert opinion of the Working Group on Prevention, AKI section, European Society of Intensive Care Medicine // Intensive care medicine. 2017. T. 43. № 6. C. 730–749.

82. Johnson G.B., Brunn G.J., Platt J.L. Activation of mammalian Toll-like receptors by endogenous agonists // Critical reviews in immunology. 2003. T. 23. № 1-2. C. 15–44.

83. Jo S.K., Sung S.A., Cho W.Y., Go K.J., Kim H.K. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats // Nephrol // Nephrol. Dial. Transplant. 2006. C. 1231–1239.

84. Jung Y.J., Kim D.H., Lee A.S., Lee S., Kang K.P., Lee S.Y., Jang K.Y., Sung M.J., Park S.K., Kim W. Peritubular capillary preservation with COMP-angiopoietin-1 decreases ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury // American journal of physiology. Renal physiology. 2009. T. 297. № 4. C. F952–60.

85. Kalakeche R., Hato T., Rhodes G., Dunn K.W., El-Achkar T.M., Plotkin Z., Sandoval R.M., Dagher P.C. Endotoxin uptake by S1 proximal tubular segment causes oxidative stress in the downstream S2 segment // *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2011. T. 22. № 8. C. 1505–1516.
86. Kellum J.A., Lameire N., KDIGO AKI Guideline Work Group. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1) // *Critical care / the Society of Critical Care Medicine*. 2013. T. 17. № 1. C. 204.
87. Kellum J.A., Sileanu F.E., Bihorac A., Hoste E.A.J., Chawla L.S. Recovery after Acute Kidney Injury // *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2017.
88. Kelly K.J., Williams W.W. Jr, Colvin R.B., Bonventre J.V. Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994. T. 91. № 2. C. 812–816.
89. Kelly K.J., Williams W.W. Jr, Colvin R.B., Meehan S.M., Springer T.A., Gutierrez-Ramos J.C., Bonventre J.V. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury // *The Journal of clinical investigation*. 1996. T. 97. № 4. C. 1056–1063.
90. Khan T.M., Khan K.N.M. Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease // *Veterinary pathology*. 2015.
91. Khwaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury // *Nephron. Clinical practice*. 2012. T. 120. № 4. C. c179–84.
92. Kim H.-J., Lee D.W., Ravichandran K., O Keys D., Akcay A., Nguyen Q., He Z., Jani A., Ljubanovic D., Edelstein C.L. NLRP3 inflammasome knockout mice are protected against ischemic but not cisplatin-induced acute kidney injury // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2013. T. 346. № 3. C. 465–472.
93. Kim H.-Y., Moon H.-S., Cao D., Lee J., Kevala K., Jun S.B., Lovinger D.M., Akbar M., Huang B.X. N-Docosahexaenoyl ethanolamide promotes development of hippocampal neurons // *Biochemical Journal*. 2011. T. 435. № 2. C. 327–336.
94. Kim H.-Y., Spector A.A. Synaptamide, endocannabinoid-like derivative of docosahexaenoic acid with cannabinoid-independent function // *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2013. T. 88. № 1. C. 121.
95. Kim W., Moon S.-O., Lee S.Y., Jang K.Y., Cho C.-H., Koh G.Y., Choi K.-S., Yoon K.-H., Sung M.J., Kim D.H., Lee S., Kang K.P., Park S.K. COMP-angiopoietin-1 ameliorates renal fibrosis in a unilateral ureteral obstruction model

// Journal of the American Society of Nephrology: JASN. 2006. T. 17. № 9. C. 2474–2483.

96. Kinsey G.R., Li L., Okusa M.D. Inflammation in Acute Kidney Injury // Nephron. Experimental nephrology. 2008. T. 109. № 4. C. e102–e107.

97. Kinsey G.R., Okusa M.D. Role of leukocytes in the pathogenesis of acute kidney injury // Critical care / the Society of Critical Care Medicine. 2012. T. 16. № 2. C. 214.

98. Korkmaz A., Kolankaya D. Protective effect of rutin on the ischemia/reperfusion induced damage in rat kidney // The Journal of surgical research. 2010. T. 164. № 2. C. 309–315.

99. Kramann R., Kusaba T., Humphreys B.D. Who regenerates the kidney tubule? // Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2015. T. 30. № 6. C. 903–910.

100. Kucuk A., Kabadere S., Tosun M., Koken T., Kinaci M.K., Isikli B., Erkasap N. Protective effects of doxycycline in ischemia/reperfusion injury on kidney // Journal of physiology and biochemistry. 2009. T. 65. № 2. C. 183–191.

101. Kurata H., Takaoka M., Kubo Y., Katayama T., Tsutsui H., Takayama J., Ohkita M., Matsumura Y. Protective effect of nitric oxide on ischemia/reperfusion-induced renal injury and endothelin-1 overproduction // European journal of pharmacology. 2005. T. 517. № 3. C. 232–239.

102. Kurts C., Panzer U., Anders H.-J., Rees A.J. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications // Nature reviews. Immunology. 2013. T. 13. № 10. C. 738–753.

103. Kwon H., Kevala K., Xin H., Patnaik S., Marugan J., Kim H.-Y. Ligand-Induced GPR110 Activation Facilitates Axon Growth after Injury // International journal of molecular sciences. 2021. T. 22. № 7. C. 3386.

104. Kwon O., Hong S.-M., Ramesh G. Diminished NO generation by injured endothelium and loss of macula densa nNOS may contribute to sustained acute kidney injury after ischemia-reperfusion // American journal of physiology. Renal physiology. 2009. T. 296. № 1. C. F25–33.

105. Labat-gest V., Tomasi S. Photothrombotic ischemia: a minimally invasive and reproducible photochemical cortical lesion model for mouse stroke studies // Journal of visualized experiments: JoVE. 2013. № 76.

106. Latyshev N.A., Ermolenko E.V., Kasyanov S.P. Concentration and

- purification of polyunsaturated fatty acids from squid liver processing wastes // European journal of lipid science and technology: EJLST. 2014. T. 116. № 11. C. 1608–1613.
107. Li H., Liu J., Wang W., Zhang Z., Li D., Lin K., Chen Z., Lin W. Matrix Metalloproteinase 9 and Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Related to Acute Kidney Injury in Severe Acute Pancreatitis Rats // Digestive diseases and sciences. 2015a. T. 60. № 12. C. 3647–3655.
108. Li H., Nord E.P. CD40 ligation stimulates MCP-1 and IL-8 production, TRAF6 recruitment, and MAPK activation in proximal tubule cells // American journal of physiology. Renal physiology. 2002. T. 282. № 6. C. F1020–33.
109. Li H., Roy Choudhury G., Zhang N., Ding S. Photothrombosis-induced Focal Ischemia as a Model of Spinal Cord Injury in Mice // Journal of visualized experiments: JoVE. 2015b. № 101. C. e53161.
110. Li L., Huang L., Sung S.-S.J., Lobo P.I., Brown M.G., Gregg R.K., Engelhard V.H., Okusa M.D. NKT cell activation mediates neutrophil IFN-gamma production and renal ischemia-reperfusion injury // Journal of immunology . 2007. T. 178. № 9. C. 5899–5911.
111. Li L., Huang L., Sung S.-S.J., Vergis A.L., Rosin D.L., Rose C.E. Jr, Lobo P.I., Okusa M.D. The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury // Kidney international. 2008. T. 74. № 12. C. 1526–1537.
112. Li L., Huang L., Vergis A.L., Ye H., Bajwa A., Narayan V., Strieter R.M., Rosin D.L., Okusa M.D. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury // The Journal of clinical investigation. 2010. T. 120. № 1. C. 331–342.
113. Li L., Okusa M.D. Macrophages, dendritic cells, and kidney ischemia-reperfusion injury // Seminars in nephrology. 2010. T. 30. № 3. C. 268–277.
114. Linfert D., Chowdhry T., Rabb H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury // Transplantation reviews . 2009. T. 23. № 1. C. 1–10.
115. Lombardi D., Becherucci F., Romagnani P. How much can the tubule regenerate and who does it? An open question // Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2015. T. 31. № 8. C. 1243–1250.
116. Lopez-Giacoman S., Madero M. Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage // World journal of nephrology. 2015. T. 4. № 1. C. 57–73.

117. Lopez-Novoa J.M., Quiros Y., Vicente L., Morales A.I., Lopez-Hernandez F.J. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view // *Kidney international*. 2011. T. 79. № 1. C. 33–45.
118. Luna L.G. *Histopathologic Methods and Color Atlas of Special Stains and Tissue Artifacts*. : American Histolabs, 1992. 767 c.
119. Majid D.S.A., Nishiyama A. Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs // *Hypertension*. 2002. T. 39. № 2. C. 293–297.
120. Makris K., Spanou L. Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes // *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*. 2016. T. 37. № 2. C. 85–98.
121. Manzhulo I., Manzhulo O., Tyrtysnaia A., Ponomarenko A., Konovalova S., Ermolenko E., Milkina E., Starinets A. Modulation of Hippocampal Astroglial Activity by Synaptamide in Rats with Neuropathic Pain // *Brain sciences*. 2021. T. 11. № 12.
122. Maremonti F., Meyer C., Linkermann A. Mechanisms and Models of Kidney Tubular Necrosis and Nephron Loss // *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2022. T. 33. № 3. C. 472–486.
123. Marin-Grez M., Fleming J.T., Steinhausen M. Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney // *Nature*. 1986. T. 324. № 6096. C. 473–476.
124. McWilliam S.J., Antoine D.J., Smyth R.L., Pirmohamed M. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity in children // *Pediatric nephrology* . 2017. T. 32. № 11. C. 2015–2025.
125. Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame // *Cell*. 2010. T. 140. № 6. C. 771–776.
126. Meijerink J., Plastina P., Vincken J.-P., Poland M., Attya M., Balvers M., Gruppen H., Gabriele B., Witkamp R.F. The ethanolamide metabolite of DHA, docosahexaenoylethanolamine, shows immunomodulating effects in mouse peritoneal and RAW264.7 macrophages: evidence for a new link between fish oil and inflammation // *The British journal of nutrition*. 2011. T. 105. № 12. C. 1798–1807.
127. Meijerink J., Poland M., Balvers M.G.J., Plastina P., Lute C., Dwarkasing J., Norren K. van, Witkamp R.F. Inhibition of COX-2-mediated eicosanoid production plays a major role in the anti-inflammatory effects of the endocannabinoid N-docosahexaenoylethanolamine (DHEA) in macrophages //

British journal of pharmacology. 2015. T. 172. № 1. C. 24–37.

128. Mercado M.G., Smith D.K., Guard E.L. Acute Kidney Injury: Diagnosis and Management // American family physician. 2019. T. 100. № 11. C. 687–694.

129. Mitaka C., Ohnuma T., Murayama T., Kunimoto F., Nagashima M., Takei T., Iguchi N., Tomita M., JAPAN Investigators. Effects of low-dose atrial natriuretic peptide infusion on cardiac surgery-associated acute kidney injury: A multicenter randomized controlled trial // Journal of critical care. 2017. T. 38. C. 253–258.

130. Mitaka C., Si M.K.H., Tulafu M., Yu Q., Uchida T., Abe S., Kitagawa M., Ikeda S., Eishi Y., Tomita M. Effects of atrial natriuretic peptide on inter-organ crosstalk among the kidney, lung, and heart in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury // Intensive Care Medicine Experimental. 2014. T. 2. № 1. C. 1–17.

131. Moisenovich M.M., Silachev D.N., Moysenovich A.M., Arkhipova A.Y., Shaitan K.V., Bogush V.G., Debabov V.G., Latanov A.V., Pevzner I.B., Zorova L.D., Babenko V.A., Plotnikov E.Y., Zorov D.B. Effects of Recombinant Spidroin rS1/9 on Brain Neural Progenitors After Photothrombosis-Induced Ischemia // Frontiers in cell and developmental biology. 2020. T. 8. C. 823.

132. Molitoris B.A. Na(+)-K(+)-ATPase that redistributes to apical membrane during ATP depletion remains functional // The American journal of physiology. 1993. T. 265. № 5 Pt 2. C. F693–7.

133. Molitoris B.A. Actin cytoskeleton in ischemic acute renal failure // Kidney international. 2004. T. 66. № 2. C. 871–883.

134. Molitoris B.A., Geerdes A., McIntosh J.R. Dissociation and redistribution of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from its surface membrane actin cytoskeletal complex during cellular ATP depletion // The Journal of clinical investigation. 1991. T. 88. № 2. C. 462–469.

135. Molitoris B.A., Marrs J. The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure // The American journal of medicine. 1999. T. 106. № 5. C. 583–592.

136. Molitoris B.A., Sutton T.A. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure // Kidney international. 2004. T. 66. № 2. C. 496–499.

137. Mongin A.A. Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: The perfect storm // Pathophysiology: the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP. 2007. T. 14. № 3-4. C. 183–193.

138. Moore P.K., Hsu R.K., Liu K.D. Management of Acute Kidney Injury: Core

Curriculum 2018 // American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation. 2018. T. 72. № 1. C. 136–148.

139. Mussap M., Noto A., Fanos V., Van Den Anker J.N. Emerging biomarkers and metabolomics for assessing toxic nephropathy and acute kidney injury (AKI) in neonatology // BioMed research international. 2014. T. 2014. C. 602526.

140. Mustafa F.H., Jaafar M.S. Comparison of wavelength-dependent penetration depths of lasers in different types of skin in photodynamic therapy // Indian Journal of Physics. 2012. T. 87. № 3. C. 203–209.

141. Naeim F., Nagesh Rao P., Grody W.W. Hematopathology: Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches. : Elsevier/Academic Press, 2008. 597 c.

142. Nakhoul N., Batuman V. Role of proximal tubules in the pathogenesis of kidney disease // Contributions to nephrology. 2011. T. 169. C. 37–50.

143. Negi S., Koreeda D., Kobayashi S., Yano T., Tatsuta K., Mima T., Shigematsu T., Ohya M. Acute kidney injury: Epidemiology, outcomes, complications, and therapeutic strategies // Seminars in dialysis. 2018. T. 31. № 5. C. 519–527.

144. Niemann-Masanek U., Mueller A., Yard B.A., Waldherr R., Woude F.J. van der. B7-1 (CD80) and B7-2 (CD 86) expression in human tubular epithelial cells in vivo and in vitro // Nephron. 2002. T. 92. № 3. C. 542–556.

145. Nourshargh S., Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues // Immunity. 2014. T. 41. № 5. C. 694–707.

146. O'Connor P.M. Renal oxygen delivery: matching delivery to metabolic demand // Clinical and experimental pharmacology & physiology. 2006. T. 33. № 10. C. 961–967.

147. Ohnishi T., Teplov A., Kawata N., Ibrahim K., Ntiamoah P., Firat C., Haneishi H., Hameed M., Shia J., Yagi Y. Three-Dimensional Vessel Segmentation in Whole-Tissue and Whole-Block Imaging Using a Deep Neural Network: Proof-of-Concept Study // The American journal of pathology. 2021. T. 191. № 3. C. 463–474.

148. Packialakshmi B., Stewart I.J., Burmeister D.M., Chung K.K., Zhou X. Large animal models for translational research in acute kidney injury // Renal failure. 2020. T. 42. № 1. C. 1042–1058.

149. Parkos C.A. Neutrophil-epithelial interactions: A double-edged sword // The American journal of pathology. 2016. T. 186. № 6. C. 1404–1416.

150. Park T., Chen H., Kevala K., Lee J.-W., Kim H.-Y. N-Docosahexaenoylethanolamine ameliorates LPS-induced neuroinflammation via cAMP/PKA-dependent signaling // *Journal of neuroinflammation*. 2016. T. 13. № 1. C. 1–15.
151. Park T., Chen H., Kim H.-Y. GPR110 (ADGRF1) mediates anti-inflammatory effects of N-docosahexaenoylethanolamine // *Journal of neuroinflammation*. 2019. T. 16. № 1. C. 1–13.
152. Plotnikov E.Y., Chupyrkina A.A., Jankauskas S.S., Pevzner I.B., Silachev D.N., Skulachev V.P., Zorov D.B. Mechanisms of nephroprotective effect of mitochondria-targeted antioxidants under rhabdomyolysis and ischemia/reperfusion // *Biochimica et biophysica acta*. 2011. T. 1812. № 1. C. 77–86.
153. Ponomarenko A.I., Tyrtysnaia A.A., Pislyagin E.A., Dyuzhen I.V., Sultanov R.M., Manzhulo I.V. N-docosahexaenoylethanolamine reduces neuroinflammation and cognitive impairment after mild traumatic brain injury in rats // *Scientific reports*. 2021. T. 11.
154. Ponomarenko A., Tyrtysnaia A., Ivashkevich D., Ermolenko E., Dyuzhen I., Manzhulo I. Synaptamide Modulates Astroglial Activity in Mild Traumatic Brain Injury // *Marine drugs*. 2022. T. 20. № 8.
155. Putzu A., Boscolo Berto M., Belletti A., Pasotti E., Cassina T., Moccetti T., Pedrazzini G. Prevention of Contrast-Induced Acute Kidney Injury by Furosemide With Matched Hydration in Patients Undergoing Interventional Procedures: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials // *JACC. Cardiovascular interventions*. 2017. T. 10. № 4. C. 355–363.
156. Quiros Y., Sánchez-González P.D., López-Hernández F.J., Morales A.I., López-Novoa J.M. Cardioprotrophin-1 administration prevents the renal toxicity of iodinated contrast media in rats // *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 2013. T. 132. № 2. C. 493–501.
157. Rabb H., Griffin M.D., McKay D.B., Swaminathan S., Pickkers P., Rosner M.H., Kellum J.A., Ronco C., Acute Dialysis Quality Initiative Consensus XIII Work Group. Inflammation in AKI: Current Understanding, Key Questions, and Knowledge Gaps // *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2016. T. 27. № 2. C. 371–379.
158. Rabelink T.J., Boer H.C. de, Zonneveld A.J. van. Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease // *Nature reviews. Nephrology*. 2010. T. 6. № 7. C. 404–414.
159. Rabelink T.J., Zonneveld A.-J. van. Coupling eNOS uncoupling to the innate

- immune response // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006. T. 26. № 12. C. 2585–2587.
160. Ramaswamy D., Corrigan G., Polhemus C., Boothroyd D., Scandling J., Sommer F.G., Alfrey E., Higgins J., Deen W.M., Olshen R., Myers B.D. Maintenance and recovery stages of postischemic acute renal failure in humans // *American journal of physiology. Renal physiology*. 2002. T. 282. № 2. C. F271–80.
161. Ramesh G., Ranganathan P. *Mouse Models and Methods for Studying Human Disease, Acute Kidney Injury (AKI) // Mouse Genetics: Methods and Protocols /* под ред. S.R. Singh, V. Coppola. New York, NY: Springer New York, 2014. C. 421–436.
162. Ramesh G., Reeves W.B. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity // *The Journal of clinical investigation*. 2002. T. 110. № 6. C. 835–842.
163. Rao K., Sethi K., Ischia J., Gibson L., Galea L., Xiao L., Yim M., Chang M., Papa N., Bolton D., Shulkes A., Baldwin G.S., Patel O. Protective effect of zinc preconditioning against renal ischemia reperfusion injury is dose dependent // *PloS one*. 2017. T. 12. № 7. C. e0180028.
164. Rashid M.A., Katakura M., Kharebava G., Kevala K., Kim H.-Y. N-Docosahexaenoylethanolamine is a potent neurogenic factor for neural stem cell differentiation // *Journal of neurochemistry*. 2013. T. 125. № 6. C. 869–884.
165. Rashid M.A., Kim H.-Y. N-Docosahexaenoylethanolamine ameliorates ethanol-induced impairment of neural stem cell neurogenic differentiation // *Neuropharmacology*. 2016. T. 102. C. 174–185.
166. Rewa O., Bagshaw S.M. Acute kidney injury-epidemiology, outcomes and economics // *Nature reviews. Nephrology*. 2014. T. 10. № 4. C. 193–207.
167. Ricci Z., Ronco C. Neonatal RIFLE // *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2013. T. 28. № 9. C. 2211–2214.
168. Robert R., Vinet M., Jamet A., Coudroy R. Effect of non-invasive remote ischemic preconditioning on intra-renal perfusion in volunteers // *Journal of nephrology*. 2017. T. 30. № 3. C. 393–395.
169. Rossaint J., Zarbock A. Pathogenesis of multiple organ failure in sepsis // *Critical reviews in immunology*. 2015. T. 35. № 4. C. 277–291.
170. Saalmuller A. *A Brief Review of the Basics of Immunology: The Innate and*

Adaptive Response // The Veterinary clinics of North America. Small animal practice. 2010. T. 40. № 3. C. 369–379.

171. Saniabadi A.R., Umemura K., Matsumoto N., Sakuma S., Nakashima M. Vessel wall injury and arterial thrombosis induced by a photochemical reaction // Thrombosis and haemostasis. 1995. T. 73. № 5. C. 868–872.

172. Schinstock C.A., Semret M.H., Wagner S.J., Borland T.M., Bryant S.C., Kashani K.B., Larson T.S., Lieske J.C. Urinalysis is more specific and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin is more sensitive for early detection of acute kidney injury // Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2013. T. 28. № 5. C. 1175–1185.

173. Schmidt A., Hoppen M., Strecker J.-K., Diederich K., Schäbitz W.-R., Schilling M., Minnerup J. Photochemically induced ischemic stroke in rats // Experimental & translational stroke medicine. 2012. T. 4. № 1. C. 13.

174. Schrier R.W., Wang W. Mechanisms of disease: Acute renal failure and sepsis // N // N. Engl. J. Med. 2004. C. 159–169.

175. Sharfuddin A.A., Sandoval R.M., Berg D.T., McDougal G.E., Campos S.B., Phillips C.L., Jones B.E., Gupta A., Grinnell B.W., Molitoris B.A. Soluble thrombomodulin protects ischemic kidneys // Journal of the American Society of Nephrology: JASN. 2009. T. 20. № 3. C. 524–534.

176. Shiva N., Sharma N., Kulkarni Y.A., Mulay S.R., Gaikwad A.B. Renal ischemia/reperfusion injury: An insight on in vitro and in vivo models // Life sciences. 2020. T. 256. C. 117860.

177. Silachev D.N., Plotnikov E.Y., Pevzner I.B., Zorova L.D., Babenko V.A., Zorov S.D., Popkov V.A., Jankauskas S.S., Zinchenko V.P., Sukhikh G.T., Zorov D.B. The Mitochondrion as a Key Regulator of Ischaemic Tolerance and Injury // Heart, lung & circulation. 2014. T. 23. № 10. C. 897–904.

178. Silveira K.D. da, Pompermayer Bosco K.S., Diniz L.R.L., Carmona A.K., Cassali G.D., Bruna-Romero O., Sousa L.P. de, Teixeira M.M., Santos R.A.S., Simões e Silva A.C., Ribeiro Vieira M.A. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in renal ischaemia/reperfusion injury in rats // Clinical science . 2010. T. 119. № 9. C. 385–394.

179. Singh A.P., Junemann A., Muthuraman A., Jaggi A.S., Singh N., Grover K., Dhawan R. Animal models of acute renal failure // Pharmacological reports: PR. 2012. T. 64. № 1. C. 31–44.

180. Solez K., Morel-Maroger L., Sraer J.D. The morphology of «acute tubular

necrosis» in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model // *Medicine*. 1979. T. 58. № 5. C. 362–376.

181. Spitzer J.A., Zhang P. Protein tyrosine kinase activity and the influence of gender in phagocytosis and tumor necrosis factor secretion in alveolar macrophages and lung-recruited neutrophils // *Shock* . 1996. T. 6. № 6. C. 426–433.

182. Sprague A.H., Khalil R.A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease // *Biochemical pharmacology*. 2009. T. 78. № 6. C. 539–552.

183. Srisawat U., Kongrat S., Muanprasat C., Chatsudthipong V. Losartan and Sodium Nitroprusside Effectively Protect against Renal Impairments after Ischemia and Reperfusion in Rats // *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2015. T. 38. № 5. C. 753–762.

184. Starinets A., Ponomarenko A., Tyrtysnaia A., Manzhulo I. Synaptamide modulates glial and neurotransmitter activity in the spinal cord during neuropathic pain // *Journal of chemical neuroanatomy*. 2023. T. 134. C. 102361.

185. Starinets A., Tyrtysnaia A., Kipryushina Y., Manzhulo I. Analgesic Activity of Synaptamide in a Rat Sciatic Nerve Chronic Constriction Injury Model // *Cells, tissues, organs*. 2022. T. 211. № 1. C. 73–84.

186. Starinets A., Tyrtysnaia A., Manzhulo I. Anti-Inflammatory Activity of Synaptamide in the Peripheral Nervous System in a Model of Sciatic Nerve Injury // *International journal of molecular sciences*. 2023. T. 24. № 7.

187. Suvarna K.S., Layton C., Bancroft J.D. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques E-Book. : Elsevier Health Sciences, 2012. 654 c.

188. Tadagavadi R.K., Reeves W.B. Renal dendritic cells ameliorate nephrotoxic acute kidney injury // *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2010. T. 21. № 1. C. 53–63.

189. Tajra L.C., Martin X., Margonari J., Blanc-Brunat N., Ishibashi M., Vivier G., Panaye G., Steghens J.P., Kawashima H., Miyasaka M., Treille-Ritouet D., Dubernard J.M., Revillard J.P. In vivo effects of monoclonal antibodies against rat beta(2) integrins on kidney ischemia-reperfusion injury // *The Journal of surgical research*. 1999. T. 87. № 1. C. 32–38.

190. Tapuria N., Kumar Y., Habib M.M., Abu Amara M., Seifalian A.M., Davidson B.R. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury--a review // *The Journal of surgical research*. 2008. T. 150. № 2. C. 304–330.

191. Turgut F., Awad A.S., Abdel-Rahman E.M. Acute Kidney Injury: Medical Causes and Pathogenesis // *Journal of clinical medicine research*. 2023. T. 12. № 1. C. 375.
192. Turner M.A., Lewis S., Hawcutt D.B., Field D. Prioritising neonatal medicines research: UK Medicines for Children Research Network scoping survey // *BMC pediatrics*. 2009. T. 9. № 1. C. 50.
193. Tyrtysnaia A., Konovalova S., Bondar A., Ermolenko E., Sultanov R., Manzhulo I. Anti-Inflammatory Activity of N-Docosahexaenoylethanolamine and N-Eicosapentaenoylethanolamine in a Mouse Model of Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation // *International journal of molecular sciences*. 2021. T. 22. № 19. C. 10728.
194. Uchino H., Fujishima J., Fukuoka K., Iwakiri T., Kamikuri A., Maeda H., Nakama K. Usefulness of urinary biomarkers for nephrotoxicity in cynomolgus monkeys treated with gentamicin, cisplatin, and puromycin aminonucleoside // *The Journal of toxicological sciences*. 2017. T. 42. № 5. C. 629–640.
195. Ungprasert P., Cheungpasitporn W., Crowson C.S., Matteson E.L. Individual non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis of observational studies // *European journal of internal medicine*. 2015. T. 26. № 4. C. 285–291.
196. Uzdensky A.B. Photothrombotic Stroke as a Model of Ischemic Stroke // *Translational stroke research*. 2018. T. 9. № 5. C. 437–451.
197. Vallés P.G., Lorenzo A.G., Bocanegra V., Vallés R. Acute kidney injury: what part do toll-like receptors play? // *International journal of nephrology and renovascular disease*. 2014. T. 7. C. 241–251.
198. Vanerio N., Stijnen M., Mol B.A.J.M. de, Kock L.M. Biomedical Applications of Photo- and Sono-Activated Rose Bengal: A Review // *Photobiomodulation, photomedicine, and laser surgery*. 2019. T. 37. № 7. C. 383–394.
199. Vaure C., Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species // *Frontiers in immunology*. 2014. T. 5. C. 316.
200. Verma A., Singhal N.K., Anand U. Photothrombotic Stroke Model // *Models and Techniques in Stroke Biology*. 2021. C. 107–115.
201. Wahl P., Schoop R., Bilic G., Neuweiler J., Le Hir M., Yoshinaga S.K., Wüthrich R.P. Renal tubular epithelial expression of the costimulatory molecule B7RP-1 (inducible costimulator ligand) // *Journal of the American Society of*

Nephrology: JASN. 2002. T. 13. № 6. C. 1517–1526.

202. Wang Z., Ying Z., Bosty-Westphal A., Zhang J., Schautz B., Later W., Heymsfield S.B., Müller M.J. Specific metabolic rates of major organs and tissues across adulthood: evaluation by mechanistic model of resting energy expenditure // The American journal of clinical nutrition. 2010. T. 92. № 6. C. 1369–1377.

203. Wargo K.A., Edwards J.D. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity // Journal of pharmacy practice. 2014. T. 27. № 6. C. 573–577.

204. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R., Wachtel M.S., Ginsberg M.D. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis // Annals of neurology. 1985. T. 17. № 5. C. 497–504.

205. Watson J.E., Kim J.S., Das A. Emerging class of omega-3 fatty acid endocannabinoids & their derivatives // Prostaglandins & other lipid mediators. 2019. T. 143. C. 106337.

206. Wen Y., Parikh C.R. Current concepts and advances in biomarkers of acute kidney injury // Critical reviews in clinical laboratory sciences. 2021. T. 58. № 5. C. 354–368.

207. Yamate J., Machida Y., Ide M., Kuwamura M., Kotani T., Sawamoto O., LaMarre J. Cisplatin-induced renal interstitial fibrosis in neonatal rats, developing as solitary nephron unit lesions // Toxicologic pathology. 2005. T. 33. № 2. C. 207–217.

208. Yang Y., Song M., Liu Y., Liu H., Sun L., Peng Y., Liu F., Venkatachalam M.A., Dong Z. Renoprotective approaches and strategies in acute kidney injury // Pharmacology & therapeutics. 2016. T. 163. C. 58–73.

209. Zager R.A., Baltes L.A., Sharma H.M., Jurkowitz M.S. Responses of the ischemic acute renal failure kidney to additional ischemic events // Kidney international. 1984. T. 26. № 5. C. 689–700.

210. Zhang M.-Z., Yao B., Yang S., Jiang L., Wang S., Fan X., Yin H., Wong K., Miyazawa T., Chen J., Chang I., Singh A., Harris R.C. CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury // The Journal of clinical investigation. 2012. T. 122. № 12. C. 4519–4532.

211. Zhang Y., Fortune B., Atchaneeyasakul L.-O., McFarland T., Mose K., Wallace P., Main J., Wilson D., Appukuttan B., Timothy Stout J. Natural History and Histology in a Rat Model of Laser-Induced Photothrombotic Retinal Vein Occlusion // Current eye research. 2008.

212. Zhang Y., Kompa A.R. A practical guide to subtotal nephrectomy in the rat

with subsequent methodology for assessing renal and cardiac function // *Nephrology* . 2014. Т. 19. № 9. С. 552–561.

213. Zuk A., Bonventre J.V., Brown D., Matlin K.S. Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney // *The American journal of physiology*. 1998. Т. 275. № 3. С. C711–31.

214. Zuk A., Gershenovich M., Ivanova Y., MacFarland R.T., Fricker S.P., Ledbetter S. CXCR<sub>4</sub>antagonism as a therapeutic approach to prevent acute kidney injury // *American journal of physiology. Renal physiology*. 2014. Т. 307. № 7. С. F783–97.

215. Певзнер И.Б., Павленко Т.А., Попков В.А., Андрианова Н.В., Зорова Л.Д., Брезгунова А.А., Плотников Е. Сравнение тяжести почечного повреждения у новорожденных и взрослых крыс при ишемии/реперфузии и введении эндотоксина // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018. Т. 165. № 2. С. 148–154.

216. Янкаускас С.С., Плотников Е.Ю., Моросанова М.А., Певзнер И.Б., Зорова Л.Д., Скулачев В.П., Зоров Д.Б. Митохондриально-адресованный антиоксидант SkQR1 предотвращает вызванную гентамицином почечную недостаточность и потерю слуха // *Биохимия*. 2012. Т. 77. № 6. С. 818–823.