© Попова Т.М.
УДК 612.46:615.099] 616-074-092.9

L-АРГІНІН: ГЛІЦИН-АМІДІНО-ТРАНСФЕРАЗА, ЯК АЛЬТЕРНАТИВНИЙ БІОМАРКЕР УРАЖЕННЯ НИРОК ПРИ ІНТОКСИКАЦІЇ У ТВАРИН В ЕКСПЕРИМЕНТІ*

Попова Т.М.

Харківська медична академія післядипломної освіти, Харків

На сегодняшний день использование человеком поверхностно-активных веществ (ПАВ) в промышленности и бытовой жизни чрезвычайно распространено. В связи с этим, вопрос исследования токсического воздействия ПАВ на органы и организм в целом является актуальным. Также необходима ранняя диагностика изменений, возникающих под влиянием ксенобиотиков. Лапрол-604 является одним из многочисленных представителей неионогенных ПАВ, который благодаря особым физико-химическим свойствам широко используется в химико-фармацевтической промышленности. По химическим характеристикам - это сложная органическая смесь полиоксипропиленполиолов, которая хорошо растворяется в воде и органических растворителях: ацетоне и спиртах. Выбор данного ксенобиотика был обоснован отсутствием в научной литературе данных о механизмах его действия на репродуктивную систему и необходимостью разработки прогностической характеристики потенциальной опасности для человека и теплокровных животных. В данном исследовании мы стремились выяснить, как Лапрол-604 влияет на показатели функционального состояния почек взрослых крыс. Трем экспериментальным группам животных (10 самцов в каждой) вводили водный раствор Лапрола-604 в различных дозах: первой группе - в дозе 1/10 ЛД50; второй - в дозе 1/100 ЛД50; третий - в дозе 1/1000 ЛД50. Ксенобиотик вводили один раз в сутки с помощью желудочного зонда в течение 30 дней. Контрольную группу составили 10 самцов крыс, находившихся на стандартном рационе вивария без введения Лапрола-604. Для оценки токсического действия Лапрола-604 на почки определяли содержание общего белка, креатинина, мочевины в сыворотке крови и моче крыс. Дополнительно определяли активность фермента L-аргинин: глицин-амидино-трансферазы в сыворотке крови крыс. Введение Лапрола-604 взрослым самцам крыс привело к олигурии, гиперазотемии, уремии и протеинурии, а также к появлению специфического для почек фермента L-аргинин: глицин-амидино-трансферазы в сыворотке крови. Уровень L-аргинин: глицин-амидино-трансферазы в сыворотке крови возрастал с повышением дозы Лапрола-604. Получена достоверная разница по концентрации L-аргинин: глицин-амидино-трансферазы в сыворотке крови между первой и второй, первой и третьей группами. Следовательно, токсическое действие Лапрола-604 на крыс приводило к метаболическим нарушениям в организме животных, и влияние было дозозависимым.

Ключевые слова: Лапрол-604, поверхностно-активное вещество, полиолы, скорость клубочковой фильтрации, креатинин, мочевина, L-аргинин: глицин-амидино-трансфераза, почки.

Вступ

На сьогоднішній день у зв'язку з поширеним використанням поверхнево-активних речовин у промисловості і побутовому житті є актуальним дослідження токсичного впливу даних речовин на організм [14, 16, 18]. У зв'язку з цим існує необхідність вивчати дію поверхнево-активних речовин (ПАР) на організм в цілому та органи окремо, розробляти ранню діагностику змін, які виникають під впливом даних ксенобіотиків. Одним із численних представників неіоногенних ПАР є Лапрол-604, який завдяки особливим фізико-хімічним властивостям широко використовується в хіміко-фармацевтичної промисловості. За хімічними характеристиками – це складна органічна суміш поліоксіпропіленполіолов, добре розчинна у воді і органічних розчинниках: ацетоні та спиртах. Вибір даного ксенобіотика був обґрунтований відсутністю в науковій літературі даних про механізми його дії на репродуктивну систему і необхідністю розробки прогностичної характеристики потенційної небезпеки для людини і теплокровних тварин. У даному дослідженні ми прагнули з'ясувати, як пренатальна дія Лапролу-604 впливає на показники функціонального стану нирок нащадків-щурів.

Відомо, що інтоксикаційний синдром характеризується накопиченням в тканинах і біологічних рідинах організму продуктів порушеного обміну речовин та метаболітів, супроводжується функціональними і морфологічними ураженнями органів та систем організму. Під час інтоксикації важливим детоксикаційним органом є нирки. На сьогодняшній день для оцінки функції нирок визначають креатинін в сироватці крові та сечі з подальшим розрахунком величини клубочкової фільтрації [10, 17, 19].

Існує уніфікований метод лабораторної діагностики фільтраційної функції нирок – визначення креатиніну в сироватці крові та сечі [4]. Метод полягає у взаємодії креатиніну з пікриновою кислотою у лужному середовищі з утворенням таутомеру пікрату креатиніну помаранчевого кольору. Цей метод є низько специфічним при проведення аналізу в біологічних рідинах, оскільки пікринова кислота взаємодіє з некреатиніновими хромогенами (протеїнами, глюкозою, ацетоном, білірубіном, ацетооцтовою та піровіноградною кислотами) з утворенням сполук, які поглинають у тій самій ділянці, що й пікрат креатиніну. Загалом кожна

* *Цитування при атестації кадрів: Попова Т.М. L-аргінін: гліцин-амідіно-трансфераза, як альтернативний біомаркер ураження нирок при інтоксикації у тварин в експерименті. // Проблеми екології і медицини. – 2017. – Т. 21, № 5-6. – С. 67–70.*

речовина, що має активну метильну групу, може реагувати з пікратом [15]. У реакцію з лужним пікратом може вступати також антикоагулянти (гепарин, цитрат, оксалат). Коливання рівня креатиніну у сироватці крові відбувається не тільки при нирковій недостатності, але і при інших патологіях. Так, підвищення вмісту креатиніну в сироватці крові відбувається при кишковій непрохідності, цукровому діабеті, патології печінки, гіпофункції надниркових залоз, гіпертиреозі, також при порушенні рівня соматотропного гормону, голодуванні, м'язовій дистрофії, великих опіках [6].

Відомо, що фермент L-аргінін: гліцин-амідінотрансфераза – є органоспецифічним для нирок. L-аргінін: гліцин-амідіно-трансфераза каталізує першу реакцію синтезу креатину, а саме перенесення амідінової групи (-NH_2- C=NH-) з L-аргініну на гліцин з утворенням продуктів реакції: L-орнітину і гуанідиноцтової кислоти. Процес відбувається тільки у нирках. Дослідження показали, що кров, сеча та тканини печінки, серця, посмугованої мускулатури, мозку, селезінки, органів травного тракту тварин і людини не активні за відношенням до реакції трансамідінування. Крім ниркової тканини, активність L-аргінін: гліцин-амідінотрансферази виявлена в тканині підшлункової залози. Однак в підшлунковій залозі фермент зв'язаний з клітинними структурами міцніше, ніж в нирках, внаслідок чого він не надходить в кровообіг при запаленні і набряку цієї залози. Тільки при панкреонекрозі L-аргінін: гліцин-амідіно-трансфераза може бути виявлена в крові. На підставі численних даних L-аргінін: гліцин амідіно-трансферазу вважають органоспецифічним ферментом нирок [12, 13].

У даному дослідженні ми прагнули з'ясувати якою мірою визначення ферменту L-аргінін: гліцин-амідінотрансферази може бути використано, як лабораторний тест для діагностики ураження нирок, яке виникло під дією ксенобіотика Лапрол-604.

Робота є фрагментом НДР ХМАПО «Патохімічні механізми дії радіотоксинів на організм та принципи їх ранньої діагностики та корекції» (номер державної реєстрації № 0117U000589).

Мета дослідження: удосконалити діагностику ураження нирок за рахунок виявлення активності L-аргінін: гліцин-амідіно-трансферази у сироватці крові щурів при інтоксикації в експерименті.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконані на 40 статевозрілих самцях щурів лінії Wistar віком 3 місяці, з масою тіла 180-210 г. Утримання і маніпуляції з тваринами здійснювали відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», (Україна, 2001), що узгоджені з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) [11].

Тварин рандомізовано поділили на 4 групи по 10 щурів в кожній: контрольну та три експериментальні. Модель інтоксикації відтворювали шляхом введення водного розчину Лапролу-604 щурам експериментальних груп. Щурам першої, другої та третьої експериментальних груп внутрішньошлунково вводили водний розчин Лапролу-604 у дозі 1/10, 1/100 та 1/1000 ЛД 50 (12,5г/кг), відповідно, один раз на добу за допомогою шлункового зонду впродовж 30 днів. Контрольну (інтактну) групу становили 10 самців щурів, які перебували на стандартному раціоні віварію, без введення Лапролу-604. Тварин всіх груп поміщали в метаболічні клітки і збирали сечу в умовах спонтанного діурезу протягом доби. Щурів декапітували під тіопенталовим наркозом, який вводили внутрішньочеревно у дозі 20мг/кг, збирали кров з магістральних судин у центрифужні пробірки. Від кожної з чотирьох груп щурів отримали зразки сироватки крові, яку зберігали при температурі – 20 °С. Для оцінки токсичної дії Лапролу-604 на нирки щурів у сироватці крові визначали вміст загального протеїну (колориметричний метод, біуретовий), креатиніну (кінетичний метод Яффе), сечовини (колориметричний метод по Бертелот) [4]. У пробах сечі визначали концентрацію загального протеїну, креатиніну, сечовини на цифровому спектрофотометрі PD-303 (Apel, Японія), згідно з інструкціями з використання стандартних тест-наборів реагентів ТОВ «СпайнЛаб» (Харків, Україна).

Розраховували показники функціонального стану нирок: діурез за добу та хвилину, швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ) за кліренсом ендогенного креатиніну, канальцеву реабсорбцію, індекс концентрації сечовини та кліренс сечовини [1]. Крім того, визначали активність L-аргінін: гліцин-амідіно-трансферази, який є органоспецифічним для нирок.

Для дослідження активності L-аргінін: гліцин-амідіно-трансферази у сироватці крові щурів застосовували колориметричний метод, запропонований Van-Pilsum J.F. та удосконалений Тимошенко О.П. [8]. Його принцип методу базується на тому, що L-аргінін: гліцин-амідіно-трансфераза каталізує, як перенесення амідінової групи з L-аргініну на гліцин, так і прискорює реакцію перенесення амідінової групи з L-канаваніну на L-орнітин з перетворенням їх в L-аргінін і L-канаванін. Утворений L-аргінін вимірюють на спектрофотометрі (при λ = 500 нм) з застосуванням кольорової реакції Сакагучі. За отриманими даними будували калібрувальний графік.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми «STATISTICA 6.0». Розраховували середнє арифметичне (M), середнє квадратичне відхилення (σ) та середню похибку середнього арифметичного (m). Оцінку ймовірності різниці середніх величин у порівнюваних групах проводили за допомогою критерію Стьюдента (t). Зміни вважали достовірними при $p<0,05$ [5].

Результати та їх обговорення

В процесі аналізу показників функції нирок тварин, які отримували Лапрол-604 виявили у них значні відхилення у порівнянні з контрольною групою щурів. Так, встановлено, що добовий діурез на 48,4%, 30,8%, та 21,6% є нижчим у щурів першої, другої та третьої експериментальних груп, відповідно, у порівнянні з інтактною групою (табл. 1).

У щурів першої групи екскреція креатиніну і сечовини достовірно знизилась в 1,8 та 1,9 разів, відповідно, порівняно з контролем. У тварин другої групи виявили вірогідне зниження виділення, як креатиніну, так і сечовини у 1,5 рази. Як наслідок – підвищення вмісту креатиніну і сечовини в сироватці крові у тварин першої групи в 2,1 та 3,2 рази, відповідно, а у тварин другої групи – в 1,8 та 2,4 рази, відповідно, порівняно з показниками щурів контрольної групи. Також виявили зниження індексу концентрації сечовини та кліренсу сечовини у 6,2 рази та у 12 раз, відповідно, у тварин першої групи порівняно з показниками інтактних тварин. Отримані результати свідчать про зниження активності виділення продуктів азотистого обміну нирками.

Таблиця 1
Вплив Лапролу-604 на фільтраційно-видільну функцію нирок щурів (M ± m)

Показники	Група щурів			
	Контрольна (n=10)	Перша 1/10 ЛД50 (n=10)	Друга 1/100 ЛД50 (n=10)	Третя 1/1000 ЛД50 (n=10)
Загальний білок сироватки крові, г/л	68,52 ± 3,14	51,48 ± 2,10[1]	57,76 ± 2,03[1*]	62,89 ± 2,80[2]
Креатинін сироватки крові, мкмоль/л	42,38 ± 3,73	87,63 ± 3,04[1]	79,75 ± 3,43[1]	51,30 ± 4,20[2]
Сечовина сироватки крові, ммоль/л	5,72±0,38	18,33 ± 0,69[1]	13,47 ± 0,75[1]	7,73 ± 1,51[2]
Загальний білок сечі, г/л	0,18 ± 0,05	0,49 ± 0,08[1]	0,36 ± 0,05[1]	0,24 ± 0,09[2]
Креатинін сечі, мкмоль/л	7374 ± 297	4243 ± 319[1]	4987 ± 314[1]	6129 ± 338[2]
Сечовина сечі, ммоль/л	83,26 ± 1,99	43,27 ± 2,65[1]	55,78 ± 2,56[1]	79,18 ± 2,36[2]
Діурез за добу, мл	15,9 ± 1,12	8,2 ± 1,4[1]	11,01 ± 1,16[1]	12,53 ± 1,17[2]
Діурез, мл/хв.	0,01104 ± 0,00012	0,00569 ± 0,00008[1]	0,00765 ± 0,00017[1]	0,00870 ± 0,00005[2]
ШКФ, мл/хв	1,92 ± 0,05	0,276 ± 0,08[1]	0,478 ± 0,06[1]	1,039 ± 0,08[2]
Канальцева реабсорбція, %	99,430 ± 0,062	97,938 ± 0,176[1]	98,399 ± 0,158[1]	98,852 ± 0,174[2]
Індекс концентрації сечовини, од.	14,56 ± 1,18	2,36 ± 0,15[1]	4,14 ± 0,26[1]	10,24 ± 1,58[2]
Кліренс сечовини, мл/хв.	0,1607 ± 0,0053	0,0134 ± 0,0016[1]	0,0317 ± 0,0024[1]	0,0891 ± 0,0019[2]
L-аргінін: гліцин-амідіно-трансфераза сироватки крові, мкмоль/с·л	-	39,73±2,15	21,88±2,66[2]	2,84±0,16[2]

Примітка: 1 - порівняно з контрольною групою (p < 0,05);
2 – порівняно з першою групою (p < 0,05).

Підвищення концентрації білку в сечі в 2,7 раз та в 2 рази при одночасному його зниженні на 25% та 17% в сироватці крові у досліджуваних тварин першої та другої групи, відповідно, вказує на порушення клубочкової фільтрації, яка характеризується зниженням в 6 та 4 рази, відповідно групі, кліренсу креатиніну в порівнянні з показниками щурів контрольної групи. Вказані зміни свідчать про виражену гіпопротеїнемію у щурів даних експериментальних груп.

Введення Лапролу-604 спричинило виникненню гіперазотемії у щурів, що можна пояснити значним зниженням виведення азотовмісних продуктів метаболізму. Найбільш високі значення азотовмісних речовин в сироватці крові зареєстровані у групі щурів, що отримали дозу Лапрола-604 1/10 ЛД 50. Виявлені зміни вказують на ступінь тяжкості токсичного пошкодження нирок під дією Лапролу-604 у дозі 1/10 ЛД 50.

Аналізуючи результати біохімічних досліджень сироватки крові та сечі щурів встановлено, що Лапрол-604 у дозах 1/10 та 1/100 ЛД50 спричинив суттєві зміни показників функціонального стану нирок тварин першої та другої експериментальних груп. Подібні зміни спостерігалися серед показників функції нирок щурів третьої групи, проте вони мали тенденційний характер. Так, вміст креатиніну та сечовини у сироватці крові самців, інтоксикованих Лапролом-604 у дозі 1/1000 підвищився на 21% та 35%, відповідно, а концентрація загального білка знизилася на 8,2%, порівняно зі щурами контрольної групи.

Поява специфічного ферменту L-аргінін: гліцин-амідіно-трансферази у сироватці крові щурів експериментальних груп свідчить про негативний вплив Лапролу-604 на нирки тварин. Було з'ясовано, що збільшення дози досліджуваного поліолу сприяє вірогідному зростанню активності L-аргінін: гліцин-амідіно-трансферази у сироватці крові щурів. Поява та збільшення активності L-аргінін: гліцин-амідіно-трансферази в сироватці крові дослідних щурів вказує на деструктивні процеси, що відбувалися в паренхімі нирок експериментальних щурів.

Рівень L-аргінін: гліцин-амідінотрансферази у сироватці крові щурів змінювався залежно від дози Лапролу-604. Отримана вірогідна різниця вмісту L-аргінін: гліцин-амідінотрансферази у сироватці крові щурів першої та другої, першої та тертої груп.

Порівняльний аналіз між показниками тварин експериментальних груп вказав, що збільшення дози Лапролу -604 призводило до появи достовірної різниці між показниками щурів першої та третьої груп. Так, добовий діурез, швидкість клубочкової фільтрації, був нижче в 1,5 та в 3,7 рази, відповідно, у самців першої групи в порівнянні з самцями третьої групи. У сироватці крові самців першої групи концентрація креатиніну та сечовини вірогідно перевищував в 1,7 та в 2,3 рази, відповідно, показники тварин третьої групи. Відмічена достовірна різниця між концентраціями загального білку у сироватках крові щурів першої та третьої груп.

Введення водного розчину Лапролу-604 впродовж 30 днів призвело до порушення фільтраційно-видільної функції нирок, що стало наслідком специфічного токсичного впливу його метаболітів (кетони, ацетон) на нирки [2, 7, 9].

Таким чином, у дослідженні виявлено достовірне підвищення рівня креатиніну, сечовини в сироватці крові тварин першої та другої груп під впливом Лапролу-604, порівняно з контролем. Це вказує на порушення виведення продуктів азотистого обміну нирками тварин цих груп. За показниками біохімічного аналізу сироватки крові та сечі щурів з'ясували, що введення Лапролу-604 у дозах 1/10 і 1/100 ЛД50 впродовж 30 днів призвело до вірогідного зменшення добового діурезу в 1,9 та 1,4 рази, відповідно, у порівнянні з контрольними значеннями, і, як наслідок, до зниження кліренсу ендогенного креатиніну.

Результатом токсичної дій Лапролу-604 стало пригнічення ниркової екскреції креатиніну та сечовини, канальцевої реабсорбції, втрата білка із сечею та по-

ява специфічного ферменту L-аргінін: гліцин-амідінотрансферази. Вплив Лапролу-604 на паренхіму нирок може здійснювати безпосередньо сам поліол, або його метаболіти. З наукових даних про механізм несприятливого впливу поліолів на живі організми відомо, що ПАР прискорюють перекисне окислення клітинних мембран. Результати досліджень інших науковців свідчать про більш токсичну та руйнівну дію, яку мають продукти розпаду і метаболіти поліолів [2,3,9]. Отримані дані дають підстави для подальших експериментальних досліджень механізму дії лапролу-604 організм в цілому.

Висновки

На підставі отриманих результатів досліджень дії Лапролу-604 на нирки щурів лінії Вістар можливо зробити наступні висновки:

1. Введення Лапролу-604 у дозах 1/10 та 1/100 ЛД 50 щурам лінії Вістар спричинило токсичне пошкодження нирок тварин, що симптоматично проявилося олігурією, гіперазотемією, уремією та протеїнурією.
2. Дія Лапролу-604 мала дозозалежний характер.
3. Так, як досліджуваний показник – фермент L-аргінін: гліцин амідінотрансфераза є органоспецифічним для нирок, то його поява у сироватці крові свідчить про патологічний стан нирок.
4. Лабораторну діагностику патології нирок тварин можна поліпшити за допомогою визначення L-аргініну: гліцин-амідінотрансферази в сироватці крові.

Література

1. Брюханов В. М., Зверев Я. Ф., Лампатов В. В., Жариков А. Ю. Методические подходы к изучению функций почек в эксперименте на животных. // Нефрология. – 2009. – Т. 13, №3. – С. 52 – 62.
2. Жуков В.И. Медико-биологические аспекты проблемы охраны водных объектов от загрязнения поверхностно активными веществами/ Жуков В.И., Кратенко Р.И., Резуненко Ю.К. [др.] // Харьков, 2000. – 397 с.
3. Жуков В.И., Маракушин Д.И., Наконечная О.А., Стеценко С.А. Влияние оксиэтилированных алкилфенолов на состояние мембран в токсикологическом эксперименте.// Медицина сьогодні і завтра. - 2012. - № 3/4. - С. 54-60.
4. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С.Камышников. – 3-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – С. 243-260. (896 с.)
5. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич // - К.: Морион, - 2000. - 320 с.
6. Назаренко О.А. Креатинін та методи його визначення / О. А. Назаренко, Т. А. Сергєєва О. П. Солдаткін // Біотехнологія. – 2009. –Т.2, №1. – С. 107-116.
7. Попова Т.М., Жарова Н.В., Колесник И.Л., Аполонина А.В., Погорелов В.В., Титкова А.В., Багмут И.Ю., Жуков В.И. Типовые патохимические реакции повреждающего действия детергентов как источников образования радиотоксинов // Проблеми екології і медицини. – 2015. – Т. 19, № 5-6. – С. 11–17.
8. Тимошенко О.П. Визначення активності трансамідіназ в сироватці крові уніфікованим методом // Клінічна біохімія / за ред. проф. О. П. Тимошенко. – К.: Професіонал, 2005. – С. 261—263.
9. Щербань Н.Г., Капустник А.В., Жуков та ін. Медико-токсикологическое изучение поверхностно-активных веществ в связи с проблемой санитарной охраны источников питьевой воды.//Международный медицинский журнал. – 2013. - №2.- С.116-120.
10. Brosnan M.E., Brosnan J.T. Renal arginine metabolism. Review article / M.E Brosnan ., J.T. Brosnan // J. Nutr.- 2004 Oct; Vol. 134.- P. 2791-2797.
11. Council of Europe [France]. Eroupean convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg,18.III.1986, http//conventions.coe.int/treaty/en/Treaties/Word/123.doc
12. Gross M.D., Eggen M.A., Simon A.M., Van Pilsum J.F. The purification and characterization of human kidney L-arginine: glycine amidinotransferase / M.D. Gross, M.A. Eggen, A.M. Simon, J.F. Van Pilsum // Arch. Biochem. Biophys.-1986.- Vol. 251.- № 2.- P.747-755.
13. Gross M.D., Simon A.M., Jenny R.J., Gray E.D., Mc.Guire D.M., Van Pilsum J.F. Multiple forms of rat kidney L-arginine: glycine amidinotransferase / M.D. Gross, A.M. Simon, R.J. Jenny, E.D. Gray, D.M. Mc.Guire, J.F. Van Pilsum // J. Nutr.-1988.- Vol.-118.- №11.-P. 1403-1409.
14. Ivanković T, Hrenović J (2010) Surfactants in the environment Arh. Hig. Rad. Toksikol. 61(1): 95-110
15. Lamb E. J., Wood J., Stowe H. J. Susceptibility of glomerular filtration rate esti mations to variations in creatinine methodology: a study in older patients E.J. Lamb, J. Wood, H.J. Stowe // Ann. Clin. Biochem. — 2005. — V. 42. — P. 11–18.
16. Murakami M, Imamura E, Shinohara H, Kiri K, Muramatsu Y, Harada A et al (2008) Occurrence and sources of perfluorinated surfactants in rivers in Japan. Environ Sci Technol 42:6566–6572
17. Nanncy Boucot Cummings M. D. and Saulo Klarh M.D. Chronic renal disease Causes, Complications and Treatment /M.D. Nanncy Boucot Cummings and M.D. Saulo Klarh. - New York and London.- Plenim medical book company, 1985.-P. 501-502.(597).
18. Olkowska E, Ruman M, Kowalska A and Polkowska Z (2013) Determination of surfactants in environmental samples. Part III. Non-ionic compounds. Ecological Chemistry and Engineering S 20 (3): 449–461.
19. Telma Bazzano, Tamy Ingrid Restel, Lenir Cardoso Porfirio et al Renal biomarkers of male and female Wistar rats (Rattus norvegicus) undergoing renal ischemia and reperfusion // Acta Cir. Bras. - .2015/- Vol.30 № 4.- P. 277-287.