

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 615.277.3:616.61-099:57.088

Т.В. Осипова, В.М. Бухман

БИОМАРКЕРЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ НЕФРОТОКСИЧНОСТИ

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, Москва

Контактная информация

Осипова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО

адрес: 115478 Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(499)324-10-65

e-mail: tvosipova2011@yandex.ru

Статья поступила 05.06.2015, принята к печати 10.08.2015.

Резюме

Применение противоопухолевых препаратов, особенно на основе платины, связано с токсическим поражением различных здоровых тканей и органов, включая почки. Среди них цисплатин занимает одно из ведущих мест и обладает наибольшей нефротоксичностью, которую в течение многих лет оценивали по уровню сывороточного креатинина и азота мочевины крови. Однако эти маркёры обладают рядом существенных недостатков и не обеспечивают раннего обнаружения ОПП. Для идентификации ранних этапов ОПП нужны новые, более информативные маркёры, которые свидетельствовали бы о появлении начальных признаков поражения очень рано и независимо от фильтрационной функции почек. В обзоре представлены характеристики современных, перспективных маркёров раннего повреждения почек. Особое внимание уделено панели маркёров, рекомендуемых для доклинического изучения потенциальной нефротоксичности лекарств-кандидатов для передачи на клинические испытания. Приведены данные исследований о роли биомаркёров в ранней диагностике ОПП, вызванных цисплатином и его аналогами. Использование ROC-анализа в этих исследованиях показало, что новые маркёры обладают большей чувствительностью и специфичностью, чем традиционный креатинин и азот мочевины крови и могут быть использованы для диагностики и мониторинга почечных поражений, вызванных лекарственными препаратами.

Ключевые слова: нефротоксичность, цисплатин, биомаркёры, диагностика.

T.V. Osipova, V.M. Bukhman

BIOMARKERS OF DRUG NEPHROTOXICITY

FSBI «N.N. Blokhin RCRC», Moscow

Abstract

Antineoplastic drugs, especially those on the basis of platinum, used for chemotherapy of cancer can also affect various normal tissues and organs including kidneys. *Cisplatin* occupies one of the leading places and possesses the greatest nephrotoxicity. For many years nephrotoxicity has been evaluated at the level of serum creatinine and of blood urea nitrogen. However these markers have a number of essential shortcomings and do not provide early detection of AKI. To identify early AKI stages new more informative markers are needed, which could make evidence of emerging initial signs of disorders at the earliest and irrespective of filtrational function of kidneys. Characteristics of modern perspective markers of early disorders of kidneys are presented in the review. Special attention is paid to the panel of markers of potential nephrotoxicity of drugs – candidates for clinical trials, which are recommended for preclinical study. The review presents data of investigations of the role of biomarkers in early diagnostics of AKI caused by *cisplatin* and its analogues. Use of the ROC analysis in these studies showed that new markers are more sensitive and specific than serum creatinine and blood urea nitrogen and can be used for diagnostics and monitoring of kidney disorders caused by chemotherapeutic drugs.

Key words: nephrotoxicity, *cisplatin*, biomarkers, diagnostics.

Введение

Нефротоксичность может развиваться при действии различных лекарств. Это осложнение свойственно, в частности, цисплатину и, в меньшей

степени, другим платиновым металлокомплексам, аминогликозидным антибиотикам, НСПВС. Лекарственная нефротоксичность оценочно наблюдается в 19–25 % случаев острого поражения почек у тяжелых больных.

Процесс разработки новых лекарств является громоздким и высоко затратным. Подсчитано, что 99 % кандидатов в новые лекарства бракуется в процессе разработки. Причём 30 % таких кандидатов бракуется во время проведения клинических исследований из-за непредвиденных профилей токсичности и побочных эффектов, включая поражение почек [81].

Задача доклинических исследований – не допустить новые нефротоксичные препараты в клинику или, в случае их высокой специфической эффективности, как можно полнее охарактеризовать этот вид токсичности, чтобы максимально обеспечить корректирующие мероприятия при клиническом использовании (уже начиная с первой фазы клинических испытаний; [11]). Для этого важно знать не только механизмы возникновения и развития нефротоксичности, но и на какие отделы нефрона направлено поражающее действие [17].

Среди противоопухолевых препаратов нефротоксичность особенно выражена у цисплатина, который широко используются в лечении большого количества злокачественных опухолей [3]. Применение цисплатина часто сопровождается поражением различных нормальных органов и тканей, включая почки. Тяжелое течение осложнений и высокая смертность пациентов в результате развития острого поражения почек, которое, в связи с прогрессом в лечении, может принять хроническое течение (хроническое повреждение почек, ХПП), значительно ограничивает его использование в клинике [6;19]). Хотя клеточные и молекулярные механизмы нефротоксичности соединений платины до конца не изучены, в основе их лежит гибель эпителиальных клеток различных отделов почечных канальцев [50]. Высокая чувствительность почек к цисплатину и, в меньшей степени, к другим препаратам платины [1; 5] объясняется тем фактом, что почки являются основным органом выделения платины. Почки накапливают платину в большей степени, чем другие органы. Прежде всего, поражается эпителий проксимальных канальцев, что может вторично приводить к гибели клеток в различных отделах почечных канальцев [47].

Биомаркеры нефротоксичности

Сывороточный креатинин (СКр, Serum creatinine, SCr), описан еще в 1904 г. СКр, имеющий молекулярный вес 113 а.е.м., синтезируется из фосфокреатинина, который, в свою очередь, является продуктом метаболизма креатина после его высвобождения из мышцы. СКр свободно фильтруется клубочком и затем экскретируется без значительного метаболизма или реабсорбции почкой. Эти свойства сделали СКр полезным суррогатным маркером для оценки функции почки, а реципрокная взаимосвязь между СКр и скоростью клубочковой фильтрации (СКФ) хорошо известна и неоднократно рассмотрена [58].

Мочевина (Urea-N), Азот мочевины крови (АМК, Blood urea nitrogen, BUN) – конечный продукт белкового катаболизма, описанный в 1952 г.

Она свободно фильтруется клубочком, пассивно реабсорбируется в проксимальных и дистальных канальцах нефрона и экскретируется в мочу в высокой концентрации. Мочевину синтезирует, прежде всего, печень в связи с поступлением белка с приёмом пищи, что является определяющим фактором ее продукции.

СКр и АМК считаются, до настоящего времени, «золотым стандартом» при использовании минимально инвазивного клинико-химического анализа. В связи с высокой способностью почек компенсировать потерю своей ткани и восстанавливаться после острого почечного инсульта чувствительность СКр и АМК очень слабая. Было продемонстрировано, что ослабление функциональной активности почек происходит только после потери двух третей почечной биомассы [30]. На параметры уровней этих двух биомаркеров влияют многие факторы. Уровень СКр, являющегося продуктом распада мышечной ткани, зависит от возраста, пола, мышечной массы и веса тела. Показано, что желудочно-кишечное кровотечение ведёт к увеличению уровня СКр при отсутствии какого-либо отрицательного влияния на почки. Уровень АМК также возрастает в сыворотке при патологических процессах типа усиленного катаболизма белков. Непочечные причины изменения уровня АМК – *застойная сердечная недостаточность, кардиальный приступ, чрезмерный уровень белка в ЖКТ, желудочно-кишечное кровотечение, гиповолемия, шок, обезвоживание*. Епочечные причины изменения уровня СКр – *застойная сердечная недостаточность, шок, обезвоживание, эклампсия, преэклампсия, рабдомиолиз (острый некроз скелетных мышц; [30])*.

Но этим традиционным маркерам присущи недостатки, ограничивающие ценность их использования. Это, во-первых, отсутствие региональной специфичности и, во-вторых, достоверные изменения уровней наступают только после поражения 30–50 % клеток (определяется с помощью гистопатологического исследования или функциональных тестов [15]) *и варьируют в зависимости от мышечной массы, возраста, пола, медикации и состояния гидратации [52]*. Считается, что традиционные сывороточные маркеры сохраняют важность для оценки функционирования почек у больных со стабильной хронической болезнью почек, но плохи в случае острого заболевания [15]. СКр и АМК являются функциональными маркерами почек, но не маркерами поражения почечных структур [14; 58; 52]. Поэтому продолжается поиск новых более эффективных биомаркеров, прежде всего – для ранней диагностики ОПП. Они необходимы для эффективного изучения нефротоксичности как на лабораторных животных, так и в клинике.

Свойства идеального биомаркера [52]:

1. он должен нарабатываться повреждёнными клетками и проявлять органоспецифичность;
2. его концентрация в организме должна быть пропорциональна выраженности поражения;

3. он должен экспрессироваться вскоре после повреждения органа, пока это повреждение ещё потенциально обратимо;
4. его концентрация должна быстро падать после эпизода острого поражения, чтобы его можно было использовать в качестве инструмента терапевтического мониторинга;
5. его измерение должно быть быстрым и надёжным.

В настоящее время известно, что первые признаки развития ОПП появляются очень рано. Поэтому актуальным является поиск новых, более информативных маркеров, которые бы свидетельствовали даже о небольших, носящих обратимый характер поражениях рано и независимо от фильтрационной функции почек [20]. Возникновение и развитие ОПП является сложным и многогранным процессом. Разные этапы его, независимо от того, чем он вызван, могут сопровождаться возникновением и накоплением в моче и в сыворотке различных биологических веществ, потенциальных маркеров происходящих процессов. Биомаркеры в моче могут появляться в результате усиления белкового синтеза в эпителиальных клетках различных отделов нефрона, нарушения процессов реабсорбции в проксимальных отделах почечных канальцев, а также в результате повреждения, гибели и восстановления эпителиальных клеток. Развитие воспалительных, аутоиммунных и иммунных процессов в свою очередь тоже может привести к появлению биомаркеров [52].

В последние годы благодаря развитию молекулярных методов анализа открыто большое количество биологических маркеров, позволяющих оценить функцию почек, возникающие поражения и предсказать их развитие. Большинство из этих маркеров можно разделить на две основные группы [79]. В первую входят маркеры, связанные со специфическим локусом поражения (клубочки, канальцы, собирательные трубки). Во вторую – маркеры, ассоциированные с механизмом поражения (воспаление, иммунная реакция, оксидативный стресс, фиброз и т.д.).

Основные характеристики биомаркеров ранней диагностики ОПП:

Альбумин (Albumin). Один из основных белков крови (приблизительно половина белка сыворотки крови). Размер и отрицательный электрический заряд не позволяют ему экскретироваться через клубочки. Поэтому альбуминурия указывает на поражение клубочков. Увеличенная экспозиция клеток проксимальных канальцев крыс к альбумину может индуцировать апоптоз путём воздействия на пограничные жирные кислоты, уровень которых повышается под действием цисплатина, гентамицина, карбапенема А, тиацетамида, гексахлоробутиона и D-серинеина [30].

Тотальный протеин (Total Protein). Тотальное количество протеина в моче, собранной у здоровых лиц, редуцировано до минимума. Большие сильно заряженные протеины клубочки не фильт-

руют. Небольшие белки, напротив, свободно проходят через клубочковый барьер и подвергаются реабсорбции проксимальными канальцами. Повышение содержания тотального количества протеина в моче указывает на поражение клубочков и/или проксимальных канальцев.

Оно происходит в результате действия цисплатина, гентамицина, ванкомицина, такролимуса, пурамицина и доксорубина [30].

Молекула повреждения почек-1 (МПП-1, Kidney injury molecule-1, KIM-1) – трансмембранный гликопротеин, кодируемый геном KIM1/TIM1/HAVERCR, который не определяется в нормальной ткани почек. Однако его экспрессия резко возрастает и достигает высоких уровней в дедифференцированных эпителиальных клетках S₃ сегмента проксимальных канальцев почек человека и грызунов после ишемических и токсических поражений [7; 8; 33]. Зрелая форма МПП-1 находится на поверхности клеток и имеет молекулярную массу 104 кДа. Внеклеточный домен этого белка с молекулярной массой 90 кДа слущивается с поверхности клеток в просвет канальцев и является растворимой формой, определяемой в моче крыс, мышей и человека при развитии острого тубулярного некроза [7]. Основным преимуществом данного белка является стабильность в моче при комнатной температуре в течение длительного времени. Этот белок определяется в почках и в моче животных при использовании различных экспериментальных моделей нефротоксичности [40]. Несмотря на то, что участие и роль этого белка в процессах повреждения и восстановления почечной ткани окончательно не изучена, МПП-1 признан полезным маркером диагностики ранних поражений проксимальных отделов почечных канальцев [33]. Увеличение экспрессии МПП-1 в ткани почек и в моче наблюдается значительно раньше, чем проявляются функциональные нарушения почек, определяемые измерением уровней СКр и АМК. МПП-1 – первый маркер, рекомендованный регуляторными властями США, Европы и Японии для доклинической оценки потенциальной нефротоксичности кандидатов в новые лекарства.

Ассоциированный с нейтрофильной желатинозой липокалин или липокалин 2 (АНЖЛ, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL) – низкомолекулярный гликопротеин с молекулярной массой 25 кДа, принадлежит к семейству липокалинов. АНЖЛ экспрессируется на очень низком уровне клетками тканей многих органов, в том числе почек, желудочно-кишечного тракта, легких. Экспрессия АНЖЛ значительно усиливается в стимулированном к пролиферации эпителии. В нормальной ткани почек белок определяется в клетках дистальных канальцев и собирательных трубок нефрона и его уровень в моче очень низкий [55; 56]. Показано, что в норме АНЖЛ участвует в процессах дифференцировки и структурной реорганизации почечных эпителиальных клеток. В случае развития ОПП эпителиальные клетки проксимальных канальцев начинают усиленно синтезировать этот белок.

Наблюдается многократное увеличение синтеза мРНК ренального АНЖЛ в клетках восходящей петли Генле и в собирательных трубочках [57]. При повреждении клеток проксимальных канальцев уровень АНЖЛ в сыворотке возрастает в 7–16 раз, а в моче в 25–1000 раз [54]. Впервые этот белок был обнаружен у мышей с ОПП, вызванным ишемией. В этих исследованиях, используя ДНК-микрочипы, наблюдали в течение первых нескольких часов после ишемического поражения многократное увеличение экспрессии 7 генов, одним из которых был АНЖЛ. В экспериментах на животных было показано, что АНЖЛ относится к числу самых ранних белков, индуцируемых в почках после ишемии и действия токсических препаратов. Резкое увеличение уровня этого белка в почках, моче и плазме в ответ на повреждение наблюдали, как у человека, так и у животных [77]. Нарастание уровня АНЖЛ происходит на 1–2 дня раньше, чем увеличение СКр и отражает степень тяжести поражения почек [38].

Результаты многочисленных исследований показали, что АНЖЛ является эффективным ранним маркером и предиктором большого числа почечных патологий, в том числе и ОПП, связанных с нефротоксичностью фармпрепаратов [2].

Цистатин С – низкомолекулярный негликозилированный белок с молекулярной массой 13 кДа, являющийся ингибитором протеаз. Синтезируется всеми ядерными клетками организма. В норме цистатин С легко фильтруется клубочками, полностью реабсорбируется и катаболизируется клетками проксимальных канальцев. При отсутствии патологии в моче регистрируется минимальная концентрация этого белка.

Однако при нарушении процесса реабсорбции в проксимальных отделах почечных канальцев его уровень в моче может возрастать до двухсот раз. Соотношение уринального цистатина С к СКр является хорошим индикатором дисфункции почечных канальцев. Вследствие этого уренальный цистатин С рассматривается, как один из важных маркеров ОПП [52; 84]. Измерение скорости клиренса цистатина С из крови в мочу, в ряде случаев (уменьшение мышечной массы, дети и старики), адекватнее оценки скорости клиренса СКр [30].

Белок, связывающий жирные кислоты L-mitina (БСЖК-L, L-type fatty acid binding protein, L-FABP). В почках человека имеется два типа БСЖК: L-тип (печеночная форма) в проксимальных отделах канальцев и H-тип (сердечная форма) в дистальных отделах [51]. Это небольшие цитоплазматические белки, экспрессированные в тканях с активным метаболизмом жирных кислот. Они участвуют во внутриклеточном транспорте липидов в митохондрии или пероксисомы. Их точные биологические функции, механизмы действия и возможности использования как маркеров ранних поражений почек мало изучены [19]. L-БСЖК – белок с молекулярной массой 14 кДа, внутриклеточный липидный шаперон, образующийся в печени, кишечнике, поджелудочной железе, лёгких, нервной

системе, желудке и клетках проксимальных канальцев. Может быть определён в плазме и моче. Этот белок есть у человека, но отсутствует у мышей. В связи с этим изучение L-БСЖК проводят на трансгенных животных. Белок легко фильтруется через клубочки и реабсорбируется в проксимальных канальцах. Уровень L-БСЖК в моче увеличивается через 12 ч после поражения проксимальных канальцев почки [63].

Интерлейкин 18 (ИЛ18, Interleukin 18, IL-18) – провоспалительный цитокин с молекулярной массой 18 кДа. Продуцируется макрофагами и эпителиальными клетками проксимальных канальцев после поражения. В экспериментах на животных было показано, что ИЛ–18 является важным медиатором в развитии ОПП разной этиологии [15; 19; 46; 64] и его уровень в моче рассматривается как потенциальный маркер ранней диагностики почечных поражений. ИЛ–18 начинает увеличиваться через 6 часов после поражения, к 12 часам его значения превышают нормальный уровень в 25 раз. Ряд исследователей указывают, что ИЛ–18 по своей чувствительности и специфичности схож с АНЖЛ, но уступает иным маркерам, таким как МПП-1 и цистатин С [15; 46; 64].

Такие *низкомолекулярные белки*, как β 2-микроглобулин, α -1-микроглобулин, ретинол-связывающий белок (РСБ), молекулярная масса которых не превышает 40 кД, также рассматриваются как маркеры острого токсического поражения почек. Молекулярный вес этих белков меньше, чем у альбумина, что способствует их фильтрации в клубочках и почти полной реабсорбции клетками проксимальных канальцев, так что их экскреция в мочу минимальна или полностью отсутствует.

Так как поражение проксимальных канальцев может ослаблять способность почек эндоцитировать эти белки, их присутствие в моче в повышенном количестве может рассматриваться как проявление поражения почек [41].

β 2-микроглобулин – белок с молекулярной массой 11,8 кДа является легкой цепью антигенов I класса главного комплекса гистосовместимости, экспрессированных на поверхности всех ядерных клеток. При развитии у пациентов аминогликозидной нефротоксичности увеличение экстракции этого белка в мочу происходит на 4–5 дней раньше повышения уровня СКр. Однако у значительной части пациентов изменения уровней были не значительны [41; 76]. Как маркер этот белок имеет существенные недостатки – нестабильность в моче, быстрая деградация при комнатной температуре и в моче с pH<6,0 [41].

Альфа-1-микроглобулин – белок с молекулярной массой 31 кДа, синтезируемый печенью и легко связывающийся с сывороточным IgA. Только его свободная форма фильтрует клубочки и реабсорбируют проксимальные канальцы. Является чувствительным маркером дисфункции проксимальных канальцев [46]. Альфа-1-микроглобулин экскретировался в патологических количествах в мочу пациентов с миелопролиферативным синдромом

мом, у которых нефротоксичность осложнила лечение интерфероном альфа-2b. Его увеличение в моче наблюдалось на несколько дней раньше, чем СКр [45]. Заболевания печени и некоторые инфекции влияют на его продукцию, что является существенным недостатком этого маркера.

Ретинол-связывающий белок (РСБ, Retinol binding protein, RBP) – является низкомолекулярным липокалином с молекулярной массой 21 кДа, связанным с транспортом в ткани витамина А. РСБ легко фильтруется клубочками и почти полностью реабсорбируется в проксимальных канальцах. При поражении проксимальных канальцев РСБ не реабсорбируется и появляется в моче. Даже незначительное повреждение функции клеток проксимальных канальцев приводит к увеличению уровня этого белка в моче. В связи с этим РСБ рассматривается как ранний маркер повреждений проксимальных канальцев. РСБ в отличие от β 2-микроглобулина стабилен при низких значениях pH [46].

В течение многих лет для диагностики ранних стадий токсических поражений почек используют в качестве маркеров определяемые в моче ферменты [4; 5]: N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза (N-АГ), гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ), аланинотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), глутаминсинтетаза (ГС), глутатион-S-трансферазы (Г-S-T- α , Г-S-T- μ , Г-S-T- π). Установлено, что локализация ферментов в различных отделах канальцев различна. Так в проксимальных отделах присутствуют N-АГ, ГГТ, АЛТ, ЩФ, ГС и Г-S-T- α , а в дистальных – ЛДГ, АСТ и Г-S-T- μ (у крыс)/Г-S-T- π (у человека) [92]. Гиперферментурия свидетельствует о разрушении эпителиальных клеток канальцев и выходе внутриклеточных ферментов в мочу, определение активности которых является ценным неинвазивным методом диагностики повреждения канальцевых структур почки [37; 91].

N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза (N-АГ, N-acethyl-beta-D-glucosaminidase, N-AG) – лизосомальный фермент с молекулярной массой >130 кДа широко используется в диагностике ранних поражений почек. Фермент локализован в эпителиальных клетках преимущественно проксимальных канальцев и является самой активной глюкозидазой в лизосомах. Раннее повышение уровня N-АГ в моче наблюдали при развитии дисфункции канальцев, в результате почечного заболевания или действия нефротоксикантов. Ложнопозитивный ответ бывает редко, активность сохраняется на протяжении всей активной фазы патологического процесса, но снижается до нормального уровня при восстановлении нормального функционирования почек или прекращении действия нефротоксиканта [70]. Источником N-АГ в моче являются клетки проксимальных канальцев, так как из-за высокой молекулярной массы белок не фильтруется клубочками. Есть данные, что уровень N-АГ в моче прямо коррелирует с тяжестью поражения канальцев [88]. Увеличение N-АГ и его изомера В в моче является чувст-

вительным тестом поражения почечных канальцев. Было показано, что ценность N-АГ как маркера, зависит от природы соединения, оказывающего нефротоксическое воздействие.

К факторам, ограничивающим его применение в диагностике почечных поражений, относятся угнетение эндогенной мочевиной, солями тяжелых металлов и увеличение уровня фермента при некоторых заболеваниях (ревматоидный артрит, гипертиреозидизм), происходящее при отсутствии ОПП, а также значительные внутри- и межвидовые вариации в моче [10; 88; 97].

Гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ, Gamma-glutamyl-transpeptidase, GGT) и щелочная фосфатаза (ЩФ, Alkyl Phosphatase, AP) также являются ферментами, локализованными в мембране щеточной каемки эпителиальных клеток проксимальных канальцев и высвобождаемыми в мочу при ее разрушении.

Токсическое поражение (гистопатология и скорость клубочковой фильтрации) почек крыс комбинацией солевого истощения с введением индометацина и контрастной среды коррелировало с увеличением уровня в моче N-АГ, но не ГГТ и ААП (аланинаминотранспептидазы) ([59]).

Глутатион-S-трансфераза (Г-S-T, Glutathione -S-transferase, GST) В 1998 г. ферменты семейства глутатион-S-трансфераз были предложены в качестве биомаркеров почечных поражений [42]. Г-S-T-зы являются семейством детоксицирующих ферментов, представленным в цитоплазме эпителиальных клеток канальцев почек. Щелочная Г-S-T, ранее известная как лигандин, присутствует в проксимальных извитых канальцах и в некоторых медуллярных канальцах почек кроликов и людей. Этот класс Г-S-T в норме не определяется в моче, но при различных повреждениях канальцев, в частности – цисплатином [29], легко высвобождается в мочу и используется, как маркер почечных нарушений. Кислая и нейтральная Г-S-T-зы присутствуют в дистальных извитых канальцах и в медуллярных канальцах, а микросомальная Г-S-T – в клубочковом и интерстициальном эндотелии и собирательных протоках, расположенных глубоко в мозговом слое [36]. Эти ферменты являются сайт-специфическими маркерами канальцевых повреждений. Существует несколько изомеров Г-S-T. Изомер Г-S-T- α локализован в эпителиальных клетках проксимальных канальцев как у человека, так и у крыс, а Г-S-T- μ (или Г-S-TY1b) – в дистальных отделах канальцев у крыс. У человека аналогом Г-S-T- μ является Г-S-T- π . Г-S-T- α считается лучшим маркером раннего тубулярного некроза [35]. Одновременное определение концентраций Г-S-T- α и Г-S-T- μ (или Г-S-T- π) позволяет проводить дифференциальную диагностику нарушений проксимальных и дистальных отделов канальцев [36].

Глутаминсинтетаза (ГС, Glutamine syntetase, GS) – фермент, локализованный в митохондриях клеток тканей различных органов, включая почки. В наибольших количествах фермент содержится в клетках начального и конечного участков S₃ сег-

мента проксимальных канальцев. Повышение активности этого фермента в моче, свидетельствует о серьезных поражениях в S₃ сегменте [83].

Кластерин (Clusterin) – гетеродимерный белок с молекулярной массой 75–80 кДа, который экспрессирован в эпителии многих органов. В почках он сильно экспрессирован на ранних стадиях развития. Напротив, в здоровой зрелой почке не определяются ни сам белок, ни его мРНК. Но кластерин появляется в почках и в моче крыс, собак и человека в ответ на токсическое воздействие и при различных заболеваниях почек [35]. Кластерин (подобно МПП-1) экспрессируется на дедифференцированных клетках канальцев почек после развития ОПП различной этиологии [16]. Предполагают, что функции этого белка связаны с регуляцией апоптоза. Он обладает антиапоптотическими свойствами и способствует клеточной адгезии и агрегации [72]. Кластерин не фильтруется клубочками и в связи с этим повышение его в моче свидетельствует о повреждении клеток почечных канальцев. Показано, что уринальный кластерин является более информативным маркером поражения проксимальных канальцев, чем АМК и СКр, а тотальный белок, цистатин-С, β₂-микроглобулин имеют преимущество перед АМК и СКр для установления повреждения клубочков [25]. На модели цисплатин-индуцированной нефротоксичности самцов крыс, продемонстрировано, что как тканевая МПП-1, так и уринальный кластерин можно рассматривать в качестве ранних маркеров острых поражений проксимальных канальцев. Поэтому они включены в панель маркеров, рекомендованных для доклинического изучения нефротоксичности лекарств [90].

Трилистниковый фактор 3 (Tf3, Trefoil factor 3, Tff3) – небольшой пептидный гормон, продуцируемый эпителиальными клетками. в почках – эпителиальными клетками собирательных трубок [13]. Одновременное измерение уровней Tf3и альбумина в моче способствовало выявлению ранних признаков поражения почечных канальцев [96].

Ренальный папиллярный антиген-1 (РПА-1, Renal papillary antigen, RPA-1) – гликопротеин с молекулярной массой 150–200 кДа, сильно экспрессированный в эпителиальных клетках собирательных трубок в папиллярной зоне почек. Высокие уровни этого белка определяются в моче у крыс под действием препаратов, вызывающих некроз клеток собирательных трубок. РПА-1 демонстрирует наибольшую по сравнению с другими маркерами специфичность в случае преимущественной локализации поражения в этом месте [27]. Изменения в уровне РПА-1 у крыс, получивших цисплатин, отражают вторичный минорный эффект повреждения проксимальных канальцев на дистальные сегменты нефрона [32; 35]. К сожалению, у человека эквивалента этому антигену пока не обнаружено.

Нетрин-1 (Netrin 1) – ламинин-подобный белок с молекулярной массой 50–75 кДа. Его биологические функции изучены мало. Предполагается, что он принимает участие в процессах неоваскуляризации, клеточной адгезии, роста нервных воло-

кон и опухолевого генеза. В норме экспрессия этого белка наблюдается во многих органах, в том числе – в почках.

Однако при поражениях почек, вызванных ишемией или нефротоксическими соединениями, уровень его экспрессии в тканях почек и содержание в моче значительно возрастают. В частности, уровень уринального нетрина 1 достигает пика уже через 6 ч после инъекции цисплатина мышам, а СКр достигает пика только через 72 ч. Уринальный уровень этого биомаркера увеличивается и при поражении почек у людей [71]. В настоящее время нетрин-1 рассматривается, как универсальный маркер для диагностики почечных нарушений при различных токсических воздействиях [41].

Остеопонтин (Osteopontin, OPN) – фосфорилированный гликопротеин, обильно представленный в костных тканях. Он ответственен за остеогенез и остеокластогенез, обнаруживаются на остеобластах и остеокластах, слабо экспрессирован в нормальных почечных канальцах, особенно в петле Генле, и может играть определённую роль в пролиферации почечных фибробластов и синтезе внеклеточного матрикса. Экспрессия его мРНК в почках крыс увеличивается под воздействием цисплатина в процессе индукции последним интерстициального фиброза почек. Почечный фиброз особенно часто проявляется при ХПН. Он развивается в результате прогрессирующих болезней, характеризующихся чрезмерным смещением внеклеточного матрикса, вырабатываемого, главным образом, миофибробластами. Инъекция цисплатина крысам может вызывать повреждение почечного эпителия и вслед за этим интерстициальный фиброз. Остеопонтин рассматривается в качестве фактора индукции макрофагов, которые играют существенную роль в развитии почечного фиброза, используется в качестве биомаркера повреждения почек; его экспрессия коррелирует с интенсивностью почечного повреждения [94; 95].

Все вышеперечисленные маркеры интенсивно изучались с целью установления их пригодности в диагностике ОПП различного происхождения, в том числе, вызываемых лекарственными препаратами. Разработка и внедрение адекватных биомаркеров нефротоксичности помогает правильно оценить токсичность в опытах на лабораторных животных, провести с наибольшей безопасностью клинические испытания новых кандидатов в лекарства (трансляционные исследования), своевременно диагностировать ОПП и ХПН, оценить динамику процесса и эффективность терапии. Новые биомаркеры нефротоксичности должны обладать достаточной чувствительностью и специфичностью, чтобы установить ранние признаки токсичности, локализацию и тяжесть поражения до того, как нарушения станут необратимыми.

Международный консорциум (The Predictive Safety Testing Consortium, PSTC), объединивший академических учёных, представителей крупных фармацевтических фирм, и администраторов регуляторных органов, рекомендовал в 2010 г. 7 лабо-

раторных тестов мочи крыс, которые сигнализируют о повреждении почек при доклиническом изучении нефротоксичности новых препаратов: МПП-1, альбумин, тотальный белок, β 2-микроглобулин, цистатин С, кластерин и Тф3. В 2014 г. рекомендовано ещё 2 биомаркера: ОПН и АНЖЛ. Эти биомаркеры в моче должны использоваться в дополнение к СКр и мочеvine/АМК [11; 18]. Уринарные маркеры в доклинических исследованиях должны использоваться вместе с традиционными сывороточными маркерами (СКр, АМК) и гистологическим исследованием.

Использование ROC-анализа показало, что новые маркеры обладают большей чувствительностью и специфичностью, чем СКр и АМК, и могут быть использованы для диагностики и мониторинга почечных поражений, вызванных лекарственными препаратами [11; 53].

Эта панель может быть расширена добавлением маркеров Г-S-T- α , Г-S-T- μ [72].

Биомаркеры ранней диагностики ОПН, вызванных препаратами платины

Развитие нефротоксичности после введения препаратов платины связано с целым каскадом процессов, включающим повреждение ДНК, оксидативный стресс, подавление белкового синтеза, нарушение функции митохондрий, апоптоз и некроз эпителиальных клеток канальцев. Токсический эффект препаратов платины зависит от используемого комплекса и связан с нарушением полярности эпителиальных клеток и механизмов базолатерального транспорта [12; 50]. К настоящему времени синтезированы тысячи производных, но используют в противоопухолевой терапии лишь несколько препаратов на основе платины, которые проявляют различную степень нефротоксичности. Эти отличия связаны с различными фармакокинетическими свойствами производных платины. Цисплатин широко применяют при лечении онкологических пациентов, что часто приводит к развитию нефротоксичности. Аналоги цисплатина (карбоплатин, недоплатин, оксалиплатин и др.), проявляя высокую противоопухолевую активность, сохраняют, хотя и в меньшей степени, чем цисплатин, нефротоксичность, так как содержат нефротоксичную платину [1; 5; 65]. Различные производные платины оказывают токсическое воздействие на разные отделы канальцевой системы почек. Карбоплатин и цисплатин поражают, преимущественно, клетки проксимальных канальцев, а недоплатин – эпителиальные клетки ренальных сосочков и дистальных отделов канальцев [86].

Экскреция платины с мочой носит экстенсивный характер. В первые сутки после в/в инъекции цисплатина животным в мочу попадает 70–90 % от введённого количества. Первоначально платина распространяется практически по всем тканям, достигая наивысших уровней в почке, печени, яичнике, матке, коже и костях [48]. Почечный клиренс свободного цисплатина достоверно не отличается при различной скорости клубочковой фильтрации, а его экскреция почками представляет

собой комплексный процесс, который включает в себя клубочковую фильтрацию, секрецию и активную реабсорбцию через транспортную систему для органических кислот [62]. Цисплатин накапливается в клетках всех отделов канальцев нефрона, но преимущественно в S₃ сегменте проксимальных канальцев. Поэтому эти участки наиболее сильно подвержены поражениям. ОПН может индуцировать даже одна доза цисплатина [22]. Нефротоксичность цисплатина является комплексным процессом, развитие которого можно разделить на три основных этапа: прямой токсический эффект на эпителиальные клетки проксимальных канальцев, приводящий к некрозу или апоптозу клеток; развитие воспалительной реакции; развитие тубулоинтерстициального фиброза [78; 95]. Раннее цитотоксическое действие цисплатина обычно связано с сильной воспалительной реакцией, сопровождаемой поражением сосудистого эндотелия в почечной ткани, которое приводит к ишемическим нарушениям, к снижению СКФ и в итоге – к острой почечной недостаточности [66].

В последние годы открыты и изучены биомаркеры, ассоциированные с ранними стадиями ОПН. Эти маркеры позволяют диагностировать нефротоксичность до того, как значительная часть функции почек будет утрачена [24]. Основной характеристикой раннего маркера является точное, безошибочное предсказание возникновения нарушения клеточных структур различных участков нефрона и корреляция его уровня в моче или в сыворотке с тяжестью этих нарушений [61].

Цисплатин вызывает поражения в проксимальных отделах канальцев у человека и у многих видов животных [32]. Показано, что крысы, получавшие цисплатин в высоких дозах, являются хорошей моделью для изучения поражений, возникающих в почечных канальцах, поскольку наблюдается картина повреждений, не отличающаяся от таковой у человека [94; 95]. Эта модель нефротоксичности детально изучена и характеризуется точно установленным локусом и тяжестью поражения [73]. В настоящее время она широко используется в исследованиях, направленных на поиск и изучение биомаркеров нефротоксичности, связанной с поражением проксимальных отделов почечных канальцев [32]. Используя эту модель, Tomomura Y. et al. исследовали 12 уринальных маркеров нефротоксичности: тотальный белок, альбумин, МПП-1, кластерин, β 2-микроглобулин, цистатин С, Г-S-T- α , Г-S-T- μ , N-АГ, ЛДГ, АСТ и АНЖЛ [82]. Через 24 ч после введения цисплатина наблюдалось увеличение в моче уровней следующих маркеров: МПП-1, Г-S-T- α , Г-S-T- μ , ЛДГ. Увеличение имело временную зависимость. Наиболее ранние и значительные увеличения были отмечены для МПП-1 – маркера, повышение экспрессии которого является специфичным при поражениях проксимальных отделов почечных канальцев и связано с ранним ответом эпителиальных клеток на токсическое воздействие [33]. Высокая диагностическая чувствительность показана и для Г-S-T- μ , который, как известно, яв-

ляется ранним маркером поражений дистальных отделов канальцев. Несмотря на то, что никаких морфологических изменений в этом отделе нефрона не наблюдали, авторы предположили, что увеличение в моче Г-S-T- μ , могло быть связано в их опытах также с поражением дистальных канальцев, так как имеются наблюдения, что цисплатин может оказывать токсический эффект на клетки петли Генле и дистальных отделов канальцев [74]. Значительные увеличения были отмечены для Г-S-T- α – маркера специфичного для поражения клеток S₃ сегмента проксимальных канальцев, хотя его увеличение было выражено в меньшей степени, чем МПП-1. Высокая чувствительность была показана и для ЛДГ. Однако известно, что этот фермент во всех отделах нефрона и не является специфичным для какого-то определенного участка. Таким образом, наблюдалось увеличение преимущественно маркеров специфичных для ранних поражений проксимальных канальцев МПП-1 и Г-S-T- α [40]. В настоящее время накоплено достаточное количество экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что МПП-1 является хорошим маркером для диагностики ОПП, развивающихся после введения различных нефротоксических препаратов, включая цисплатин [41]. При исследовании диагностической значимости 4 маркеров (МПП-1, СКр, АМК и N-АГ) на различных моделях нефротоксичности, в том числе – с использованием цисплатина, показано, что уровень уринального МПП-1 положительно коррелирует с уровнем морфологических нарушений в эпителии проксимальных канальцев. Даже при незначительных морфологических изменениях МПП-1 оказался единственным из 4 маркеров, способным рано определить эти поражения [89]. Оценена способность идентифицировать ранние поражения почек у крыс после однократного внутрибрюшинного введения цисплатина с помощью следующих маркеров: МПП-1, Г-S-T- α , альбумин, АНЖЛ, остеоопонтин, Г-S-T- μ , РПА-1, кластерин [53]. Изменения уровней маркеров были соотнесены с морфологическими изменениями, наблюдаемыми в различных отделах нефрона. Показано, что повышение в моче уровней МПП-1, Г-S-T- α и альбумина коррелировало с появлением и развитием ранних признаков поражения проксимальных канальцев. Увеличению уровня МПП-1 в моче предшествовало увеличение экспрессии этого белка в эпителиальных клетках канальцев, а увеличение Г-S-T- α было связано с увеличением его высвобождения из поврежденных клеток канальцев. Увеличение уровня тотального альбумина в моче являлось следствием нарушения процессов реабсорбции в проксимальных отделах почечных канальцев. Несмотря на то, что этиология повышения уровней этих маркеров различна, они показали большую чувствительность и специфичность в идентификации ранних поражений почечных канальцев, чем другие исследуемые маркеры, включая СКр и АМК. Многократное увеличение в моче МПП-1 отмечали Vaidya V.S. et al. у крыс через 24 ч после введения цисплатина, в то время как уров-

ни СКр, АМК и N-АГ не изменялись. Авторами отмечена четкая связь между уровнем маркера в моче и тяжестью морфологических изменений в проксимальных канальцах [87]. Значительное увеличение Г-S-T- α наблюдали Gautier J.C. et al. в первые 48 ч после введения цисплатина крысам линий Han Wistar и Sprague-Dawley. Повышение уровня маркера в моче происходило одновременно с развитием некроза в клетках S₃ сегмента. Увеличение уровня фермента наблюдалось раньше и было более выражено, чем увеличение АМК, N-АГ, СКр и тотального белка. Два других маркера Г-S-T- μ и РПА-1, исследуемые в этой работе, также увеличивались, но в более поздние (на 5 день после введения препарата) сроки [32]. Увеличение Г-S-T- μ и РПА-1, по предположению авторов, связано с нарушениями в дистальных отделах нефрона, которые являются следствием поражения проксимальных канальцев. В этих исследованиях отмечены линейные различия в чувствительности к токсическому действию цисплатина у крыс. Значительное повышение этого маркера отмечали у больных с опухолями головы и шеи через 6 ч после введения цисплатина. Подъем уровня Г-S-T- α наблюдался задолго до повышения СКр [75].

В исследовании Vinken P. et al. изучалась динамика изменений в моче и в ткани почек крыс трёх маркеров (МПП-1, остеоопонтин и кластерин) после однократного внутрибрюшинного введения цисплатина. Через 24 ч отмечено увеличение экспрессии МПП-1 в клетках проксимальных канальцев с последующим 20-кратным повышением уровня этого маркера в моче. Авторы отметили, что МПП-1 и кластерин в моче являлись самыми чувствительными маркерами для диагностики поражений, индуцированных цисплатином, и должны быть включены в доклинические токсикологические исследования [90].

Экспериментально на мышах показано, что нефротоксичность, вызванная цисплатином, сопровождается ранним значительным повышением АНЖЛ [55]. Увеличение АНЖЛ наблюдали в моче через 3 ч после внутрибрюшинного введения препарата в дозе, вызывающей некроз и апоптоз клеток проксимальных канальцев. Увеличение маркера происходило значительно раньше, чем увеличение N-АГ и СКр и до того, как регистрировались изменения в СКФ. В связи с этим авторы сделали вывод, что уринальный АНЖЛ может являться ранним маркером диагностики почечных поражений, вызванных цисплатином. Увеличение этого маркера в моче наблюдали также у больных с различными солидными опухолями на 1–3; 7 и 15 дни после лечения цисплатином [31]. Однако Kos FT et al. не наблюдали никакой корреляции между уровнем сывороточного АНЖЛ и развитием почечных поражений у больных после введения цисплатина [44]. N-АГ, ГГТ, ЛДГ и тотальный белок использовались в работе Uehara T. et al. для оценки нефротоксического эффекта недоплатина в сравнении с цисплатином. Уровень этих маркеров в моче крыс достигал максимальных значений на 4 день после

введения препаратов и возвращался полностью или частично к нормальному лишь к 7 дню. При этом введение цисплатина вызывало повышение этих маркёров в большей степени, чем введение недоплатина, который обладает меньшим нефротоксическим эффектом. В этих исследованиях авторы наблюдали у крыс гендерные различия в уровне указанных маркёров в моче. В контрольной группе они, особенно ГГТ, были значительно ниже у самок, чем у самцов [85]. Devarajan P. et al. использовали N-АГ как чувствительный маркёр поражения проксимальных канальцев, для сравнительного изучения нефротоксического эффекта липоплатина и цисплатина. Показано, что тяжесть токсического эффекта положительно коррелировала с уровнем маркёра в моче. Гибель эпителиальных клеток, вызываемая цисплатином, сопровождалась многократным увеличением этого маркёра, достигавшим максимума на 5 день после введения препарата. При введении липоплатина поражения клеток канальцев были незначительными, и уровень N-АГ повышался незначительно. Таким образом, этот маркёр позволяет оценить тяжесть структурных нарушений в канальцевом аппарате почек [22]. Появление в моче ферментов (ферментурия) ЛДГ, ГГТ и N-АГ широко используется в течение многих лет для оценки нефротоксического действия цисплатина и его производных, поскольку данные ферменты считаются чувствительными маркёрами поражения канальцев. Wolfgang GH et al., исследуя нефротоксичность карбоплатина в сравнении с цисплатином, показали, что повышение уровня каждого из этих маркёров в моче крыс зависит от тяжести токсического воздействия препарата. ЛДГ оказался самым чувствительным индикатором токсичности. Его уровень увеличивался в 6 раз при введении цисплатина, в то время как введение карбоплатина, менее токсического препарата, не изменило уровень ЛДГ по сравнению с контролем. Уровни ГГТ и N-АГ были умеренно увеличены при введении обоих препаратов [93]. В настоящее время надёжным и многообещающим маркёром ранних поражений рассматривают белок нетрин-1, так как его увеличение наблюдали в ранние сроки развития ОПП разной этиологии, в том числе – и при действии нефротоксических препаратов [71]. Внутривенное введение мышам цисплатина в дозе 20 мг/кг приводило к 10-кратному увеличению уровня этого белка в моче через 1 час, а пик достигался через 6 часов после инъекции. В то же время увеличение СКр и АМК наблюдалось только через 72 часа. Показано, что нетрин-1 усиливает пролиферацию клеток и процессы регенерации в ответ на повреждение, поэтому он может быть использован как прогностический маркёр восстановления почечных канальцев [9]. Faubel S. et al. отмечали возрастание уровня ИЛ-18 при развитии ОПП, вызванном введением цисплатина [28]. Ряд исследователей полагают, что ИЛ-18 по своей чувствительности и специфичности схож с АНЖЛ, но уступает другим маркёрам, таким как МПП-1 и цистатин С [15]. Однако этот белок недостаточно хо-

рошо изучен в качестве маркёра для установления ранних поражений, вызываемых различными лекарственными препаратами. Интересные результаты были получены при изучении L-БСЖК в качестве маркёра ранних поражений, вызванных введением цисплатина. Исследования выполнены на трансгенных мышах, так как этот белок представлен в клетках проксимальных канальцев человека и отсутствует у мышей. Показано, что уровень маркёра увеличивается в моче уже через два часа после введения препарата, в то время как повышение традиционных маркёров (АМК и СКр) наблюдается через 48 ч. Была установлена четкая корреляция между тяжестью патоморфологических изменений и уровнем L-БСЖК в моче. Увеличение этого маркёра напрямую зависело от дозы цисплатина. Авторы считают, что токсические поражения, вызываемые цисплатином, могут быть предсказаны с помощью уринального L-БСЖК точнее и раньше, чем с помощью других маркёров [61]. По уровню кластерина и микроальбумина в моче крыс показано: карбоплатин так же, как цисплатин, преимущественно, хотя и в меньшей степени, поражает проксимальные отделы почечных канальцев. Эти нарушения сопровождались увеличением уровней кластерина и микроальбумина [26].

Vinken P. et al. показали, что традиционные маркёры СКр и АМК не могли быть использованы у крыс для раннего обнаружения почечных поражений, вызванных введением цисплатина. Уровень кластерина в моче и экспрессия МПП-1 в эпителиальных клетках проксимальных канальцев были самыми чувствительными маркёрами для оценки раннего проявления нефротоксичности. Увеличение уровня МПП-1 и остеопонтина в моче коррелировали с прогрессией почечного поражения. Авторы пришли к выводу, что в токсикологических исследованиях новых препаратов гистохимические исследования следует сочетать с измерением уровней МПП-1 и остеопонтина в моче [90].

В настоящее время установлено, что для идентификации ранних поражений почек наиболее информативны маркёры, определяемые в моче. Маркёры же, определяемые в сыворотке крови, свидетельствуют о более поздних и тяжелых поражениях [23]. Оценка диагностической эффективности новых уринальных биомаркёров нефротоксичности цисплатина у крыс проведена в серии исследований Pinches M. et al. [67]. Авторы использовали традиционные маркёры мочи (глюкоза, тотальный белок и N-АГ) и 7 новых (альбумин, Г-S-T- α , Г-S-TYb1, АНЖЛ, МПП-1, остеопонтин, RPA-1). Уровни МПП-1, остеопонтина и альбумина коррелировали со степенью тяжести поражения проксимальных канальцев.

Использование ROC-анализа показало, что диагностическая эффективность большинства новых биомаркёров, за исключением Г-S-T- α , Г-S-TYb1 и цистатина С, значительно превосходит таковую АМК и СКр. В этих работах были исследованы биологические вариации и установлены референс значения новых уринальных маркёров у крыс.

Таким образом, общим характерным признаком, ассоциированным с нефротоксичностью препаратов платины, является поражение эпителиальных клеток почечных канальцев. Для диагностики ранних стадий развития осложнений, вызванного этими препаратами, при ОПП следует использовать маркёры поражения эпителия почечных канальцев.

Комбинация биомаркёров ОПП. Создание мультиплексных диагностических систем

Возникновение и развитие ОПП является сложным, многостадийным процессом, который невозможно охарактеризовать с помощью одного маркёра. Все существующие на сегодняшний день маркёры нефротоксичности, индуцированной фармпрепаратами, не имеют достаточной чувствительности и специфичности. Вследствие этого они ограниченно пригодны для диагностики ранних поражений почек. Одновременное измерение нескольких маркёров и их сравнительный анализ оказываются более информативными и надежными в диагностике ОПП, чем применение одного маркёра, даже самого чувствительного [11; 21]. Для большинства биомаркёров нефротоксичности разработаны диагностические иммуноферментные наборы на основе ИФА, которые имеют как преимущества, так и недостатки. Основным преимуществом является возможность измерения низких концентраций биомаркёров, а недостатком – узкий динамический диапазон и возможность измерения в одном образце только одного аналита.

Разработка методов мультиплексного анализа на основе технологии Luminex xMAP позволяет одновременно измерять до ста маркёров в одном образце небольшого объема мочи, плазмы или сыворотки.

Преимущество Luminex xMAP технологии состоит в возможности нанесения «зондов» по индивидуальному протоколу и создании гибких схем, лёгкой оптимизации анализа под условия конкретного эксперимента. В настоящее время разработаны диагностические наборы с различными комбинациями маркёров нефротоксичности для крыс (и человека), которые обеспечивают определение основных биомаркёров спустя несколько часов после действия повреждающих агентов, что позволяет быстро и эффективно тестировать лекарственные средства до начала клинических испытаний [30]. Комбинирование маркёров является трудной задачей и требует дальнейших исследований, так как на сегодняшний день нет чёткого представления о том, в каких сочетаниях объединять маркёры в панели для диагностики ОПП разной этиологии, каким должно быть их оптимальное соотношение и т.д. [34].

Для изучения нефротоксического эффекта цисплатина и других производных платины наряду с традиционными функциональными маркёрами (СКр, АМК) используют разнообразные маркёры, которые могут быть классифицированы как ферменты, высвобождаемые из поврежденных клеток канальцев (ЩФ, ГГТ, АЛТ, ЛДГ, Г-S-Ts, N-АГ), низкомолекулярные белки (α 1-микроглобулин, β 2-

микроглобулин, РСБ, цистатин С) и белки, продуцируемые клетками канальцев в ответ на поражение (МПП-1, липокалин 2, L-FABP, ИЛ-18). Открытие в будущем новых маркёров и детальное изучение уже известных позволит создать панель маркёров, способных предсказать нефротоксический эффект, индуцированный препаратами платины [46; 60].

Использование современных технологий для поиска потенциальных биомаркёров ОПП

В последние годы осуществлен значительный прогресс в идентификации новых биомаркёров раннего поражения почечных канальцев у лабораторных животных и у человека [49]. Развитие геномных, транскриптомных, протеомных и метаболомных технологий способствовало открытию новых более перспективных современных маркёров – ДНК-овых, транскрипционных и метаболитических. Такие маркёры расширяют возможность своевременного отслеживания начала и обратимости возникших поражений. Изменения в экспрессии генов являются самыми ранними признаками токсического воздействия и наступают значительно раньше, чем морфологические изменения [7; 43]. ДНК-овые микрочипы становятся стандартной технологией в молекулярной токсикологии. Они позволяют одновременно отслеживать экспрессию большого количества генов. Применение микрочипов в исследованиях ренальных поражений позволило идентифицировать ранние изменения в экспрессии генов и сопоставить их с точной локализацией поражения в структурах почки [43]. В настоящее время делаются попытки с помощью ДНК-чипов классифицировать нефротоксические соединения на основе профиля экспрессии генов. Huang Q. et al. изучали экспрессию генов при развитии нефротоксичности, вызванной цисплатином, используя *in vivo* и *in vitro* системы [39].

У крыс после введения цисплатина в дозе, вызывающей тубулярный некроз, были отмечены изменения в экспрессии генов окислительного стресса, регуляторов концентрации внутриклеточного кальция (SMP30), ингибиторов клеточного цикла (waf1), генов MLY (MDR1), генов, кодирующих белки кластерин, JGFBP-1 и ТИМП-1. В печени крыс никаких нарушений в генной экспрессии не наблюдали.

Сравнивая профили экспрессии *in vivo* и *in vitro*, авторы обнаружили значительные различия между этими системами. Это позволило авторам сделать вывод: данные, полученные *in vitro*, следует с осторожностью переносить на модели *in vivo*.

Thompson K.L. et al., используя технологию ДНК-микроррей для неклинической оценки нефротоксичности цисплатина, идентифицировали генные маркёры и показали, что профиль генной экспрессии связан со специфичностью поражения ткани и механизмом токсичности. Идентифицировано 93 гена с разным уровнем экспрессии у крыс, получавших цисплатин.

Показано, что экспрессия генов, связанных с клеточной адгезией (Spp1, Colla1, Clu, Lgals3) и с

энзимами детоксикации (Г-S-Tm2, Г-S-Tr2) была снижена, а экспрессия генов, локализованных в проксимальных канальцах (Odc1, Oat, Kap) и генов, кодирующих ростовые факторы и их связывающие белки (Egf, Ghr, Ngfg, Igfbp3), была увеличена [80]. Uehara T. et al., изучая генный профиль у крыс после однократного введения недоплатина, показали увеличение экспрессии генов, связанных с апоптозом, регуляцией клеточного цикла, метаболизмом ДНК, миграцией и адгезией клеток, организацией цитоскелета и оксидативного стресса (Hmax1, Mtl1, Glrx1, Г-S-Tm1).

Показано значительное повышение экспрессии генов, кодирующих цитокератины 14 и 19, что, по предположению авторов, могло быть связано с особенностями регенерации эпителия сосочков и собирательных трубок, наблюдаемой после введения недоплатина. Изучение картины экспрессии генов позволило авторам сделать вывод, что механизм действия недоплатина так же, как цисплатина, связан с оксидативным стрессом [86].

В настоящее время экспрессия генов, связанных с различными типами токсичности, интенсивно изучается. В частности – с целью установления генов, которые могут быть использованы как маркёры ранних почечных поражений.

Благодаря молекулярно-генетическим методам исследований были выявлены гены, которые в результате токсического воздействия подвергаются ранней индукции и усиленной экспрессии. Белки, кодируемые этими генами (МПП-1, кластерин, АНЖЛ) признаны новыми, более совершенными, чем традиционные, маркёрами для диагностики ОПП [7]. Показано, что увеличение экспрессии гена МПП-1 происходит раньше, чем наблюдаются морфологические изменения.

Установлена корреляция между уровнем генной экспрессии и тяжестью поражения. Увеличение экспрессии МПП-1 наблюдается даже при дозах препарата, не вызывающих изменения морфологической картины [14].

Применение метаболомных исследований в поиске биохимических маркёров ОПП, вызванных цисплатином.

В последние годы кроме геномных и протеомных подходов в поиске новых маркёров используют метаболомные технологии, основанные на определении профиля продуктов метаболизма. Это принципиально новый тип маркёров, включающий аминокислоты, пептиды, полиамины и т.д., которые, как оказалось, могут идентифицировать ранние поражения почек, вызванные введением токсических препаратов. Если раньше изучалась лишь небольшая часть компонентов метаболизма биологических систем, сейчас с помощью новых аналитических методов можно получить полный метаболомный профиль этих систем.

Для метаболомного анализа могут быть использованы самые современные аналитические методы: масс-спектрометрия, спектроскопия ядерного магнитного резонанса, высокоэффективная жидкостная хроматография и др.

Одна из основных задач метаболомных исследований состоит в определении раннего метаболомного профиля токсичности, который может быть использован (индивидуально) в оценке качества и безопасности лекарственных препаратов для человека и животных. Portilla D. et al. проводили биохимический анализ эндогенных метаболитов в сыворотке, моче и ткани почек мышей после однократного введения цисплатина [68; 69].

Показано, что цисплатин вызывал в моче мышей уникальный метаболомный профиль, который может быть биомаркёром нефротоксичности. Этот профиль характеризовался повышенными уровнями глюкозы; таких аминокислот, как аланин, валин, лейцин, метионин; присутствием метаболитов трихлоруксусной кислоты – пируватов и лактатов. Изменения в метаболоме мочи происходили рано и предшествовали увеличению уровня СКр и, как отмечали авторы, были связаны с механизмом токсического действия цисплатина на проксимальные отделы почечных канальцев.

Заключение

Нефротоксичность является одним из самых тяжелых и серьезных побочных эффектов применения цисплатина и других препаратов платины, а также многих других лекарств. К настоящему времени синтезировано и используется в противоопухолевой терапии большое количество новых препаратов на основе платины, которые проявляют различную степень нефротоксичности.

Эти различия связаны с фармакинетическими свойствами новых производных. Так как аналоги цисплатина (карбоплатин, недоплатин, оксалиплатин и др.) содержат токсичную для почек платину, они сохраняют нефротоксичность, хотя и в меньшей степени, чем цисплатин.

В течение многих лет для оценки индуцированной лекарствами нефротоксичности использовали функциональные маркёры (СКр и АМК) и энзимы (N-АГ, ГГТ, ЩФ, ЛДГ). Однако первые признаки токсического эффекта возникают очень рано и для их установления нужны новые, более совершенные маркёры. Разработанная на крысах модель нефротоксичности, индуцированной цисплатином, широко используется в исследованиях, направленных на поиск биомаркёров, связанных с поражением почечных канальцев.

Открытые в последние годы белковые маркёры (МПП-1, липокалин 2, РПА-1, нетрин-1, Тф3, L-БСЖК) обладают достаточной чувствительностью, чтобы предсказать токсичность препарата на этапе доклинических испытаний и направить дальнейшие исследования на создание производных, действующих на ту же мишень, но не проявляющих токсичность.

В настоящее время для изучения нефротоксического эффекта кандидатов в лекарства наряду с традиционными функциональными маркёрами (СКр, АМК) используются разнообразные маркёры (см. табл.).

Т а б л и ц а

Некоторые уринальные биомаркёры, предсказывающие поражённую область нефрона и препараты-индукторы нефротоксичности [11; 30]

Отдел нефрона	Уринальный биомаркёр	Примеры повреждающих препаратов
Клубочки	Тотальный белок, цистатин С, α -1-микроглобулин, β 2-микроглобулин, альбумин, МИФ, подоцин	пурамицин
Проксимальные канальцы	α -1-микроглобулин, β 2-микроглобулин, МПП-1, кластерин, Г-S-T- α , цистатин С, VEGF, АНЖЛ, ТИМП-1, N-АГ, нетрин-1, РСБ, ИЛ-18, ФРГ, Суг61, Na^+/H -обменник-3, экзосомальный фетуин-А, L-БСЖК, тотальный белок, Тф3	цисплатин, карбоплатин, гентамицин и другие аминогликозиды
Петля Генле	ОПН, Na^+/H -обменник-3,	Анальгетики
Дистальные канальцы	ОПН, кластерин, кальбиндинD28, VEGF, АНЖЛ, Г-S-T- α/μ , Н- БСЖК	недоплатин
Собираательные трубки	кальбиндинD28, РПА-1	недоплатин, нестероидные противовоспалительные лекарства

Это могут быть энзимы, высвобождаемые из поврежденных клеток канальцев (ЩФ, ГТТ, АЛТ, ЛДГ, Г-S-Ts, N-АГ), низкомолекулярные белки (α 1-микроглобулин, β 2-микроглобулин, РСБ, цистатин С) и белки, продуцируемые клетками канальцев в ответ на поражение (МПП-1, липокалин2, L-БСЖК, нетрин-1, РПА-1, ИЛ-18). Детальное изучение уже известных и открытие в будущем новых маркёров позволит создать панель маркёров, способных предсказать нефротоксический эффект препаратов. Разработанные мультиплексные диагностические системы, дают возможность исследовать различные комбинации маркёров нефротоксичности для человека и крыс, обеспечивают определение основных маркёров спустя несколько часов после воздействия повреждающих агентов. Возрастает возможность эффективного тестирования лекарственных средств до начала клинических испытаний.

Развитие геномных и протеомных технологий на основе микрочипов способствует открытию новых, более перспективных, современных маркёров: геномных, транскрипционных и метаболических. Так, выявлены гены, которые в результате токсического воздействия цисплатина, подвергаются ранней индукции и усиленной экспрессии. Изучение генной экспрессии позволит установить гены, которые могут быть использованы как маркёры ранних почечных поражений. Применение метаболомных технологий позволяет установить уникальный метаболомный профиль, характерный для нефротоксичности, индуцированной платиновыми препаратами. Показано, что изменения в метаболизме мочи происходят рано, предшествуют увеличению уровня СКр и связаны с механизмом токсического действия цисплатина на проксимальные отделы почечных канальцев.

Литература

1. Абаев В.М., Любимова Н.В., Михайлова Л.М. и др. Экспериментальное исследование токсического действия циклоплатина на почки и печень // Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. – 2000. – №3. – С. 43–51.
2. Вельков В.В., Резникова О.И. Современная лабораторная диагностика ренальных патологий: от ранних стадий до острой почечной недостаточности // Лабораторная диагностика. – 2010. – Т. 4, № 54. – С. 59–65.
3. Купчан Д.З. Характеристика отдельных противоопухолевых препаратов. Переводчикова Н.И. (ред.) Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. 3-е изд., доп. и пер. – М.: Практическая медицина, 2011. – С. 72–119.
4. Кушлинский Н.Е., Любимова Н.В., Дурнов Л.А. и др. Значение ферментурии в оценке нефротоксичности противоопухолевых химиотерапии у детей // БЭБМ – 1997. – №10. – С. 446–50.
5. Любимова Н.В., Топчиева С.В., Аверинова С.Г. и др. Современные методы диагностики и мониторинга нефротоксичности при проведении противоопухолевой химиотерапии производными платины // БЭБМ. – 2000. – № 9. – С. 317–23.
6. Поддубная И.В., Орёл Н.Ф. Побочные реакции и осложнения лекарственной терапии. Поражение мочевыводящей системы. Переводчикова Н.И. (ред.) Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. 3-е изд., доп. и пер. – М.: Практическая медицина, 2011. – С. 425–46; 437–9.
7. Amin R.P., Vickers A.E., Sistare F. et al. Identification of putative gene based markers of renal toxicity // Environ Health Perspect. – 2004. – 112(4) – P. 465–79.
8. Bailly V., Zhang Z., Meier W. et al. Shedding of kidney injury molecule 1 a putative adhesion protein involved in renal regeneration // J.Biol.Chem. – 2002. – 277(42). – P. 39739–48.

9. Basnakian A.G. Netrin 1: universal biomarker for acute kidney injury // *Am.J.Physiol.Renal.Physiol.* – 2008. – 294(4). – P. F729–30.
10. Bondiou M.T., Bourbouze R., Bernard M. et al. *Inhibition of A and B N-acetyl-beta-D-glucosaminidase urinary isoenzymes by urea* // *Clin Chim Acta.* – 1985. – 149(1). – P. 67–73.
11. Bonventre J.V., Vaidya V.S., Schmodder R. et al. *Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity* // *Nat.Biotechnol.* – 2010. – 28(5). – P. 436–40.
12. Bouliskas T., Vougiouka M. *Cisplatin and platinum drugs at the molecular level* // *Oncol.Rep.* – 2003. – 10(6). – P. 1663–82.
13. Chinery R., Poulson R., Elia G. et al. *Expression and purification of a trefoil peptide motif in a beta-galactosidase fusion protein and its use to search for trefoil-binding sites* // *Eur.J.Biochem.* – 1993. – 212. – P. 557–63.
14. Chiusolo A., Defazio R., Zanetti E. et al. *Kidney injury molecule 1 expression in rat proximal tubule after treatment with segment-specific nephrotoxics: A tool for early screening of potential kidney toxicity* // *Toxicol Pathology.* – 2010. – 38(3). – P. 338–45.
15. Coca S.G., Parikh C.R. *Urinary biomarkers for acute kidney injury: perspectives on translation* // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2008. – 3(2). – P. 481–90.
16. Correa-Roffo R. *Induction of clasterin in tubules of nephritic rats* // *J.Am.Soc.Nephrol.* – 1998. – 9. – P. 33–7.
17. Cristofori P., Zanetti E., Fregona D. et al. *Renal proximal tubule segment-specific nephrotoxicity: An review on biomarkers and histopathology* // *Toxicologic Pathology.* – 2007. – 35. – P. 270–5.
18. Critical Path Institute. *Letter of support for two rodent kidney safety biomarkers* // 2014. <http://c-path.org/programs/pstc/regulatory-successes/>
19. de Geus H.R., Betjes M.G., Bakker J. *Biomarkers for prediction of acute kidney injury: narrative review on current status and future challenges* // *Clin.Kidney J.* – 2012. – 5. – P. 102–8.
20. Devarajan P. *Emerging urinary biomarkers in the diagnosis of acute kidney injury* // *Expert.Opin.Med.Diag.* – 2008. – 2(4). – P. 387–98.
21. Devarajan P. *Emerging biomarkers for the early detection of acute kidney injury* // *Nephrology.* – 2010. – 5(2). – P. 38–44.
22. Devarajan P., Tarabishi R., Mishra J. et al. *Low renal toxicity of lipoplatin compared to cisplatin in animals* // *Anticancer Res.* – 2004. – 24 (4). – P. 2193–200.
23. Dharnidharka V.R., Kwon C., Stevens G. *Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis* // *J. Kidney Dis.* – 2002. – 40(2). – P. 221–6.
24. Dieterle F., Marrer E., Suzuki E. et al. *Monitoring kidney safety in drug development: emerging technologies and their implication* // *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.* – 2008. – 11(1). – P. 60–71.
25. Dieterle F., Perentes E., Cordier A. et al. *Urinary clasterin, β_2 -microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injury* // *Nat.Biotethnol.* – 2010. – 28. – P. 463–9.
26. Dodiya H., Mukul J., Goswami S. *Study of urinary biomarkers for nephrotoxicity in Wistar rats* // *J.Pharmacol.Toxicol.* – 2011. – 6(6). – P. 571–9.
27. Falkenberg F.W., Hildebrand H., Lutte L. et al. *Urinary antigens as markers of papillary toxicity: I. Identification and characterization of rats kidney papillary antigens with monoclonal antibodies* // *Arch.Toxicol.* – 1996. – 71(1–2). – P. 80–92.
28. Faubel S., Lewis E.C., Reznikov L. et al. *Cisplatin induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin IL-1 β , IL18, IL6, and neutrophil infiltration in the kidney* // *J.Pharmacol.Exp.Ther.* – 2007. – 322 (1). – P. 8–15.
29. Feinfeld D.A., Fuh V.L., Safirstein R. *Urinary glutathione-S-transferase in cisplatin nephrotoxicity in the rat* // *J Clin Chem Clin Biochem.* – 1986. – 24(8). – P. 529–32.
30. Fuchs T.C., Hewitt P. *Biomarkers for drug-induced damage and nephrotoxicity. An overview for applied toxicology* // *The AAPS Journal.* – 2011. – 13(4). – P. 615–31.
31. Gaspari F., Cravedi P., Mandalà M. et al. *Predicting cisplatin-induced acute kidney injury neutrophil gelatinase-associated lipocalin excretion: a pilot prospective case-control study* // *Nephron.Clin.Pract.* – 2010. – 115(2). – P. 154–60.
32. Gautier J.C., Riefke B., Walter J. et al. *Evaluation of new biomarkers of nephrotoxicity in two strains of rat treated with cisplatin* // *Toxicology Pathology.* – 2010. – 38(6). – P. 943–56.
33. Han W.K., Bailly V., Abichandani R. et al. *Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury kidney* // *Kidney International.* – 2002. – 62. – P. 237–44.
34. Han W.K., Waikar S.S., Johnson A. et al. *Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury* // *Kidney International.* – 2008. – 73. – P. 863–9.
35. Harpur E., Ennulat D., Hoffman D. et al. *Biological quantification of biomarkers of chemical-induced renal toxicity in two strains of male rat* // *Toxicological Sciences.* – 2011. – 122(2). – P. 235–52.
36. Harrison D.J., Kharbanda R., Cunningham D.S. et al. *Distribution of glutathione-S-transferase isoenzymes in human kidney: basis for possible markers of renal injury* // *J.Clin.Pathol.* – 1989. – 42. – P. 624–8.
37. Hofmeister R., Bhargava A.S., Günzel P. *Value of enzyme determinations in urine for the diagnosis of*

- nephrotoxicity in rats // *Clin. Chim. Acta.* – 1986. – 160(2). – P. 163–7.
38. Honore P.M., Joannes-Boyau O., Boer W. et al. *The early biomarker of acute kidney injury: in search of the Holy Grail* // *Intensive Care Med.* – 2007. – 33. – P. 1866–8.
 39. Huang Q., Dunn R.T., Jayadev S. et al. *Assessment of cisplatin-induced nephrotoxicity by microarray technology* // *Toxicol. Sci.* – 2001. – 63(2). – P. 196–207.
 40. Ichimura T., Hung C.C., Yang S.A. et al. *Kidney injury molecule-1 a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury* // *Am.J.Physiol.Renal.Physiol.* – 2004. – 286. – P. F552–63.
 41. Khan E., Batuman V., Lertora J.J. *Emergence of biomarkers in nephropharmacology* // *Biomark. Med.* – 2010. – 4(6). – P. 805–14.
 42. Kilty C., Doyle S., Hassett B. et al. *Glutation-S- transferases as biomarkers of organ damage: application of rodent and canine Γ -S-T enzyme immunoassays* // *Chem.Biol.Interact* – 1998. – 111–112. – P. 123–5.
 43. Kondo C., Minowa Y., Uehara T. et al. *Identification of genomic biomarkers for concurrent diagnosis of drug induced renal tubular injury using a large-scale toxicogenomic database* // *Toxicology.* – 2009. – 265(1–2). – P. 15–26.
 44. Kos F.T., Sendur M.A., Aksoy S. et al. *Evaluation of renal function using the level of Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is not predictive of nephrotoxicity associated with cisplatin-based chemotherapy* // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2013. – 14(2). – P. 1111–4.
 45. Kurschel E., Metz-Kurschel U., Niederle N. et al. *Investigations on the subclinical and clinical nephrotoxicity of interferon- α 2B in patients with myeloproliferative syndromes* // *Ren.Fail.* – 1991. – 13. – P. 87–93.
 46. Lisowska-Myjak B. *Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury* // *Blood Purif.* – 2010. – 29. – P. 357–65.
 47. Litterst C.L., Gram T.E., Dedrick R.L. et al. *Distribution and disposition of platinum following intravenous administration of cis-diamminedichloroplatinum(II) (NSC 119875) to dogs* // *Cancer Res.* – 1976. – 36(7 PT 1). P. 2340–4.
 48. Litterst CL, LeRoy AF, Guarino AM. *Disposition and distribution of platinum following parenteral administration of cis-dichlorodiammineplatinum(II) to animals* // *Cancer Treat Rep.* – 1979. – 63(9–10). – P. 1485–92.
 49. Lock E.A. *Toxicological highlight. Sensitive and early markers of renal injury. Where are we and what is the way forward?* // *Toxicological Sciences.* – 2010. – 116(1). – P. 1–4.
 50. Ludwig T., Riethmüller C., Gekle M. et al. *Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport* // *Kidney International.* – 2004. – 66. – P. 196–202.
 51. Maatman R.G., van de Westerlo E.M., van Kuppevelt T.H. et al. *Molecular identification of the liver and heart-type fatty acid-binding protein in human and rat kidney. Use of the reverse transcriptase polymerase chain reaction* // *Biochem.J.* – 1992. – 288(Pt.1). – P. 285–90.
 52. Mårtensson J., Martling C.R., Bell M. *Novel biomarkers of acute kidney injury and failure: clinical applicability* // *Brit.J.Anesthesia.* – 2012. – 109(6). – P. 843–50.
 53. Mc Duffie J.E., Ma J.Y., Sablab M. et al. *Time course of renal proximal tubule injury reversal and related biomarker changes in rats following cisplatin administration* // *Int.J.Toxicol.* – 2013. – 32(4). – P. 251–60.
 54. Mishra J., Ma Q., Prada A. et al. *Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury* // *J.Am.Soc.Nephrol.* – 2003. – 14(10). – P. 2534–43.
 55. Mishra J., Mori K., Ma Q. et al. *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin a novel early urinary biomarkers for cisplatin nephrotoxicity* // *Am.J.Nephrol.* – 2004. – 24(3). – P. 307–15.
 56. Mishra J., Mori K., Ma Q. et al. *Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin* // *Am.J.Soc.Nephrol.* – 2004. – 15. – P. 3073–82.
 57. Mishra J., Ma Q., Kelly C. et al. *Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation* // *Pediatr.Nephrol.* – 2006. – 21. – P. 856–63.
 58. Moran S.M., Myers B.D. *Course of acute renal of feature studied by a model of creatinine kinetics* // *Kidney International.* – 1985. – 27. – P. 928–37.
 59. Naidu S.G., Lee F.T. *Contrast nephrotoxicity: predictive value of urinary enzyme markers in a rat model* // *Acad.Radiol.* – 1994. – 1(1). – P. 3–9.
 60. Nasri H. *Comment on: A model for prediction of cisplatin-induced nephrotoxicity by kidney weight in experimental rats* // *J.Res.Med. Sciences.* – 2013. – 18(12). – P. 1119–200.
 61. Negishi K., Noiri E., Doi K. et al. *Monitoring urinary L-type fatty acid binding protein predicts histological severity of acute kidney injury* // *Amer.J. Pathology.* – 2009. – 174(4). – P. 1154–9.
 62. Osman N.M., Litterst C.L. *Effect of probenecid and N'-methylnicotinamide on renal handling of cis-dichlorodiammineplatinum-II in rats* // *Cancer Lett.* – 1983. – 19(1). – P. 107–11.
 63. Ostermann M., Philips B.J., Forni L.G. *Clinical review. Biomarkers of acute kidney injury: Where are we now?* // *Critical Care.* – 2012. – 16. – P. 233.
 64. Parikh C.R., Jani A., Melnikov V.Y. et al. *Urinary IL18 is a marker of human acute tubular necrosis* // *Am.J.Kidney Dis.* – 2004. – 43. – P. 405–14.
 65. Pasetto L.M., D'Andrea M.R., Brandes A.A. et al. *The development of platinum compounds and their possi-*

- ble combination // *Crit.Rev.Oncol.Hematol.* – 2006. – 60. – P. 59–75.
66. Perazella M.A., Moeckel G.W. *Nephrotoxicity from chemotherapeutic agents: clinical manifestations pathobiology and prevention therapy* // *Semin. Nephrol.* – 2010. – 30(6). – P. 570–81.
67. Pinches M., Betts C., Bickerton S. et al. Evaluation of novel renal biomarkers with cisplatin model of kidney injury: gender and dosage differences // *Toxicol.Pathol.* – 2012. – 40. – P. 522–33.
68. Portilla D., Li S., Nagothu K.K. et al. *Metabolomic study of cisplatin-induced nephrotoxicity* // *Kidney Int.* – 2006. – 69. – P. 2194–204.
69. Portilla D., Schnackenberg L., Beger R.D. Metabolomics as an extension of proteomic analysis: study of acute kidney injury // *Semin Nephrol.* – 2007 – 27. – P. 609–20.
70. Price R.G. *The role NAG (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity* // *Clin.Nephrol.* – 1992. – 38(suppl.1). – P. S14–9.
71. Reeves W.B., Kwon O., Ramesh G. *Netrin 1 and kidney injury. II. Netrin 1 as an early biomarkers of acute kidney injury* // *Am.J.Physiol.Renal.Physiol.* – 2008. – 294. – P. F731–8.
72. Rosenberg M.E., Silksens J. *Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations* // *Int.J.Biochem.Cell.Biol.* – 1995. – 27. – P. 633–45.
73. Safirstein R., Winston J., Goldstein M. et al. *Cisplatin nephrotoxicity* // *Am.J. Kidney Dis.* – 1986. – 8. – P. 356–67.
74. Sahni V., Choudhury D., Ahmed Z. et al. *Chemotherapy-associated renal dysfunction* // *Nat.Rev.Nephrol.* – 2009. – 5(8). – P. 450–62.
75. Saleena U.V., Athiyamaan M., Vadhira B.M. et al. *Urinary α -glutathione-S-transferase variations in cisplatin treated cancer patients with and without kidney injury* // *Internat.Conf. on Bioscience, Biochemistry, Bioinformatics. IPCBEE.* – 2012 – 31. – P. 32–9.
76. Schentag J.J. *Specificity of renal tubular damage criteria for aminoglycoside nephrotoxicity in critically ill patients* // *J.Clin.Pharmacol.* – 1983. – 23(10). – P. 473–83.
77. Schmidt-Ott K.M., Mori K., Kalandadze A. et al. *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia* // *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* – 2006. – 15(4). – P. 442–9.
78. Taguchi T., Razzaque M.S. *Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. Razzaque MS, Taguchi T (eds): Cellular stress responses in renal diseases. Contrub.Nephrol. Basel: Karger, 2005. – 148. – P. 106–20.*
79. Tesch G.H. *Serum and urine biomarkers of kidney disease: A pathophysiological perspective* // *Nephrology.* – 2010. – 15. – P. 609–16.
80. Thompson K.L., Afshari C.A., Amin R.P. et al. Identification of platform-independent gene expression markers of cisplatin nephrotoxicity // *Environmental Health Perspectives.* – 2004. – 119(4). – P 488–94.
81. Thukral S.K., Nordone P.J., Hu R. et al. *Prediction of nephrotoxicant action and identification of candidate toxicity-related biomarkers* // *Toxicol. Pathol.* – 2005. – 33. – P. 343–55.
82. Tonomura Y., Tsuchiya N., Torii M. et al. *Evaluation of the usefulness of urinary biomarkers for nephrotoxicity in rats* // *Toxicology.* – 2010. – 273. – P. 53–9.
83. Trevisan A., Cristofori P., Fanelli G. *Glutamine synthetase activity in rat urine as sensitive marker to detect S3 segment specific injury of proximal tubule induced by xenobiotics* // *Arch. Toxicol.* – 1999. – 73(4–5). – P. 255–62.
84. Uchida K., Gotoh A. *Measurement of cystatin C and creatinine in urine* // *Clin.Chem.Acta.* – 2002. – 323. – P. 121–8.
85. Uehara T., Watanabe H., Itoh F. et al. *Nephrotoxicity of a novel antineoplastic platinum complex nedaplatin: a comparative study with cisplatin in rats* // *Arch.Toxicol.* – 2005. – 79(8). – P. 451–60.
86. Uehara T., Yamate J., Torii M. et al. *Comparative nephrotoxicity of cisplatin and nedaplatin mechanisms and histopathological characteristic* // *J.Toxicol.Patol.* – 2011. – 24. – P. 87–94.
87. Vaidya V.S., Ramirez V., Ichimura T. et al. *Urinary kidney injury molecule 1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury* // *Am.J.Physiol.Renal.Physiol.* – 2006. – 290(2). – P. F517–29.
88. Vaidya V.S., Ferguson M.A., Bonventre J.V. *Biomarkers of acute kidney injury* // *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* – 2008. – 48. – P. 463–8.
89. Vaidya V.S., Ozer J.S., Frank D. et al. *Kidney injury molecule 1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in multi-site preclinical biomarker qualification studies* // *Nat.Biotechnol.* – 2010. – 28(5). – P. 478–85.
90. Vinken P., Starckx S., Barale-Thomas E. et al. *Tissue kim-1 and urinary clusterin as early indicators of cisplatin-induced acute kidney injury in rats* // *Toxicol.Pathol.* – 2012. – 40(7). – P. 1049–62.
91. Westhuyzen J., Endre Z.H., Reece G. et al. *Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit* // *Nephrol Dial Transplant.* – 2003. – 18(3). – P. 543–51.
92. Whiting P.H., Brown P.A. *The relation between enzymuria and kidney enzyme activities in experimental gentamicin nephrotoxicity* // *Ren.Tail.* – 1996. – 18(6). – P. 899–909.

93. Wolfgang G.H., Dominick M.A., Walsh K.M. et al. *Comparative nephrotoxicity of a novel platinum compound cisplatin and carboplatin in male Wistar rats* // *Fund.Appl.Toxicology*. – 1994. – 22(1). – P. 73–9.
94. Yamate J., Tatsumi M., Nakatsuji S. et al. Immunohistochemical observations on the kinetics of macrophages and myofibroblasts in rat renal interstitial fibrosis induced by cis-diamminedichloroplatinum // *J. Compar. Pathol.* – 1995. – 112(1). – 27–39.
95. Yano R., Golbar H.M., Izawa T. et al. *Participation of bone morphogenetic protein (BMP)-6 and osteopontin in cisplatin (CDDP)-induced rat renal fibrosis* // *Exp Toxicol Pathol.* – 2015. – 67(2). – P. 99–107.
96. Yu Y., Jin H., Holder D. et al. *Urinary biomarkers trefoil factor 3 and albumine enable early detection of kidney tubular injury* // *Nat. Biotechnol.* – 2010. – 28(5). – P. 470–7.
97. Zhou Y., Vaidya V.S., Brown R.P. et al. Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium // *Toxicol Sci.* – 2008. – 101(1). – P. 159–70.