

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Утверждено
Решением Ученого совета
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России
«27» декабря 2022 года (протокол № 5)

Методические рекомендации
«Применение маркеров нефротоксичности (Cystatin C, KIM-1, NGAL)
антимикробных препаратов при внебольничных инфекциях нижних
дыхательных путей»

г. Москва 2022

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Ответственный исполнитель Старший аналитик научного отдела клинической фармакологии Института исследований и разработок, канд. фарм. наук | Е.Ю. Демченкова |
| Исполнители: Главный научный сотрудник ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, академик РАН, д-р. мед. наук, профессор | В.Г. Кукес |
| Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств ФГБУ «НЦ ЭСМП» Минздрава России, д-р. мед. наук, профессор | В.А. Меркулов |
| Заместитель начальника научного отдела клинической фармакологии Института исследований и разработок, д-р мед. наук, проф. | М.В. Журавлева |
| Начальник научного отдела клинической фармакологии Института исследований и разработок, д-р мед. наук | А.Б. Прокофьев |
| Старший аналитик научного отдела клинической фармакологии Института исследований и разработок | В.А. Евтеев |

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ | 216 |
| ВВЕДЕНИЕ | 217 |
| 1. Нефротоксичность | 218 |
| 1.1 Острое повреждение почек | 219 |
| 1.2 Хроническая болезнь почек | 220 |
| 1.3 Профилактика нефротоксичности АБП | 222 |
| 2 Биомаркеры повреждения почек | 222 |
| 2.1 Классические маркеры острого повреждения почек | 223 |
| 2.2 Биомаркеры острого повреждения почек | 224 |
| 2.3 Маркеры повреждения | 225 |
| 2.4 Маркеры нарушения функции | 231 |
| 2.5 Биомаркеры и локализация нарушений | 234 |
| 2.6 Изучение возможности применения предиктивных маркеров нефротоксичности (Cystatin-C, Clusterin) в прогнозировании нефротоксичности ванкомицина | 235 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 237 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ | 240 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1 Таблица – Характеристики биомаркеров нефротоксичности | 248 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 2 Методика определения Кластерина | 251 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 3 Методика определения Цистатина С | 253 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 4 Методика определения KIM-1 методом ELISA | 256 |

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

| | |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| АБП | – антибактериальный препарат |
| АБТ | – антибактериальная терапия |
| ГГТ | – гамма-глутаминтрансфераза |
| КК | – клиренс креатинина |
| ЛП | – лекарственный препарат |
| ЛС | – лекарственное средство |
| МПК | – минимальная подавляющая концентрация |
| НР | – нежелательная реакция |
| ОБП | – острая болезнь почек |
| ОПП | – острое повреждение почек |
| СКФ | – скорость клубочковой фильтрации |
| ТЛМ | – терапевтический лекарственный мониторинг |
| ХБП | – хроническая болезнь почек |
| ХПН | – хроническая печеночная недостаточность |
| ХСН | – хроническая сердечная недостаточность |
| ЩФ | – щелочная фосфатаза |
| Cys C | – Cystatin C (Цистатин С) |
| CLU | – Clusterin (Кластерин) |
| FDA | – Food And Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) |
| KIM-1 | – Kidney Injury Molecule-1 (молекула повреждения почек) |
| NAG | – N-ацетил-D-глюкозаминидаза |
| NAM | – N-ацетилмурамовая кислота |
| NGAL | – neutrophil gelatinase-associated lipocalin (липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов) |
| OPN | – osteopontin (остеопонтин) |

ВВЕДЕНИЕ

Токсическое действие АБП часто является многофакторным, с сопутствующими нефротоксическими, септическими и ишемическими компонентами и с перекрывающимися патогенетическими механизмами развития НР. Чувствительность и специфичность используемых в клинической практике общепринятых показателей токсичности АБП не позволяют идентифицировать и дифференцировать ранние сигналы и определить механизмы ОПП в начальной стадии процесса.

Безопасность антибактериальных препаратов можно повысить путем более широкого использования существующих и разработки новых маркеров НР, а также ряда приемов коррекции дозирования ЛС. ОПП - одна из основных причин летальности в группе больных с тяжелой патологией. Сложность раннего распознавания ОПП связана с вовлечением механизмов адаптации и дезадаптации как макроорганизма, так и нефрона к инфекционному процессу, для купирования которого назначается АБП. Доказано, что при отсутствии клинических проявлений канальцевые повреждения повышают риск прогрессирования дисфункции почек. Биомаркеры ОПП должны обладать способностью к топической диагностике поврежденного сегмента нефрона, указывать на причины, характер и длительность повреждения почек (ОПП, ОБП, ХБП). Необходима высокая специфичность и чувствительность в дифференциальной диагностике патогенетических вариантов ОПП. Маркер должен иметь прогностическое значение в отношении продолжительности и исходов ОПП и предоставлять возможность динамического контроля эффективности проводимой терапии. ОПП является чувствительным индикатором и, одновременно, следствием токсического действия АБП. Необходимо рассматривать весь спектр НР, связанных с АБТ и формировать линейки маркеров ОПП с маркерами других НР.

АБП могут оказывать нефротоксическое действие. Лекарственно-индуцированная нефропатия у взрослых составляет 20–40% от всех случаев

выявленного в стационаре ОПП [1–3]. По данным китайского исследования С. Liu и соавт. (2021) из 1960 случаев диагностированного в госпитальных условиях внутрибольничного ОПП лекарственные средства (ЛС) вызвали 735 (37%) ОПП, при этом на антибактериальные препараты пришлось 87% от общего количества противoinфекционных ЛС, госпитальная смертность составила 14%, у 54% выживших сформировалась ХБП [1-4].

Tomono K. et al., (2018) провели шестимесячное проспективное наблюдательное исследование в Университетской больнице Осаки, чтобы описать частоту НР у пациентов, госпитализированных в общие отделения, получающих лечение антибиотиками широкого спектра. НР соответствовало любым проявлениям после 48 часов или более системной антибактериальной терапии. В исследовании наиболее часто назначаемыми антибиотиками были пиперациллин/тазобактам (242 случая), меропенем (181 случай) и ванкомицин (92 случая) [5].

1 Нефротоксичность

Нефротоксическое действие АБП может быть вызвано прямым дозозависимым токсическим действием препаратов этой группы и их метаболитов на почечные структуры, или развиваться по иммунному механизму. Высока роль гипоксии в развитии нефротоксичности. Возможна кумуляция лекарств и продуктов их метаболизма в структурах нефрона, наиболее часто в мезангии и базальной мембране, в канальцах и интерстиции, вокруг сосудов. Антибиотико-индуцированная нефропатия может протекать бессимптомно и быть обратимой (Фанкони-подобный синдром или дистальный тубулярный ацидоз) либо приводить к тяжелому поражению почек, связанному с некрозом почечных канальцев, таблица В.1 [6].

Таблица В.1 – Общая характеристика нефротоксичности вызываемой антибиотиками

| Антибиотик | Механизм | Клинические проявления |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Аминогликозиды | Прямое токсическое действие на дистальные канальцы | Фанкони-подобный синдром ОКН |
| Бета-лактамы | Прямое токсическое действие на дистальные канальцы | ОКН Острый гломерулонефрит |
| Сульфаметоксазин/триметоприм | Нарушение секреции креатинина Ингибирование натриевых каналов | ОКН Ложное повышение креатинина Гиперкалиемия |
| Фторхинолоны | Повреждение канальцев Структурное сходство с хинином | ОКН Микротромбоангиопатия |
| Ванкомицин | Прямое токсическое действие на проксимальные канальцы | ОИН ОКН |
| Даптомицин | Рабдомиолиз | Тубулопатия, вызванная миоглобином |
| Полимиксины | Прямое токсическое действие на проксимальные канальцы | ОКН |

1.1 Острое повреждение почек

ОПП - это патологическое состояние, развивающееся в результате непосредственного острого воздействия ренальных и/или экстраренальных повреждающих факторов, продолжающееся до 7-ми суток и характеризующееся быстрым (часы-дни) развитием признаков повреждения или дисфункции почек различной степени выраженности. ОПП может быть вызвано различными причинами, в том числе АБП. Некроз клеток возникает после выраженного повреждения в более чувствительных сегментах нефрона, апоптоз преобладает после менее тяжелого повреждения и в резистентных к ишемии дистальных сегментах нефрона. За апоптозом может последовать «вторичный некроз», особенно если апоптотические клетки не удаляются быстро. Апоптоз после ишемического ОПП происходит двумя волнами, как показано на моделях лабораторных животных. Первую волну можно обнаружить в течение 6-12 часов после повреждения, она достигает

пика примерно через 3 дня и быстро уменьшается. Эта фаза удаляет ранее здоровые клетки канальцев, тем самым способствуя последующей дисфункции. Вторая волна становится очевидной примерно через 1 неделю, удаляет гиперпластические клетки и, следовательно, может играть роль в ремоделировании поврежденных канальцев. В случае персистенции острого повреждения почечной паренхимы может развиваться патологический континуум повреждения почек, который представлен динамикой (временными критериями) перехода от ОПП к ОБП и к ХБП [7]. ОПП – независимый фактор риска хронической почечной недостаточности (ХПН), терминальной почечной недостаточности, смерти и серьезных внепочечных осложнений [8]. Существует прямая корреляция между временем выявления ОПП и смертностью. Таким образом, как можно более раннее определение ЛП, «виновного» в развитии повреждения почек, и вовремя принятые меры помогут уменьшить количество случаев ЛПП и смертность²¹.

Нефротоксичность цефалоспоринов может усиливаться одновременным применением ванкомицина. Нефротоксический эффект ванкомицина в ряде случаев может проявляться острой почечной недостаточностью вследствие тубулоинтерстициального нефрита в сроки от одного дня до 6 недель от начала лечения. Нефропатия может быть проявлением цитотоксической IgG аллергической реакции II типа, которая развивается через 5-15 дней после начала приема и не всегда проявляется во время госпитализации.

1.2 Хроническая болезнь почек

ХБП - это патологическое состояние, возникающее либо в результате перманентного (первично хронического) воздействия ренальных и/или экстраренальных повреждающих факторов, либо являющееся исходом ОБП, продолжающейся свыше 90 суток. Таким образом, при ретроспективном анализе медицинских карт можно зафиксировать только ОПП и часть

²¹ https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/DEN130031.pdf

проявлений ОБП. По данным литературы, восстановление функции почек при выписке соответствует показателям КК ниже верхнего порогового (у мужчин 115 ммоль/л; у женщин 99 ммоль/л). Частичное восстановление определяют как снижение КК на 25% или более от максимальной концентрации, но остающееся выше порогового или исходного уровня, а неспособность восстановиться - как перевод на диализ или снижение КК <25% от исходного уровня [9]. Исходный уровень КК соответствует наименьшему значению КК, доступного в течение 3 месяцев до поступления и/или до начала АБТ при поступлении в стационар. Данные КК позволяют использовать параметр скорости клубочковой (гломерулярной) фильтрации. Скорость клубочковой (гломерулярной) фильтрации - это расчетный показатель, который определяется величинами почечного плазмотока, фильтрационного давления, фильтрационной поверхности и зависит от массы действующих нефронов. У пациентов старческого возраста с исходно высокими показателями КК и ХБП в анамнезе, а также на фоне интоксикационного синдрома и приема совместно с АБП нефротоксичных препаратов (фуросемид, НПВП), и при отсутствии данных исходного уровня КК, нефротоксичность определяется, когда КК при выписке превышает на 25% или более минимальную концентрацию [10]. Альбуминурия отражает эндотелиальную дисфункцию, является маркером прогрессирования ХБП. Небольшое увеличение альбуминурии связано с ремоделированием правого и левого желудочков, патологической реакцией сердечнососудистой системы и хронической патологией легких. Чувствительность и специфичность вышеуказанных общепринятых показателей не позволяют идентифицировать и дифференцировать ранние сигналы и определить механизмы острого повреждения почек в начальной стадии процесса. В настоящее время достигнуты определенные успехи в идентификации биомаркеров ОПП, позволяющих определить не только возникновение на ранних этапах, но и спрогнозировать риск развития ОПП у

пациентов из группы риска, а также оценить тяжесть течения и степень восстановления почек после ОПП [11].

1.3 Профилактика нефротоксичности АБП

Для минимизации рисков АБТ у пациентов с ХБП разработаны следующие рекомендации²²: применять ЛС с внепочечным выведением; проводить коррекцию доз ЛП, использовать терапевтический лекарственный мониторинг. Поводом коррекции дозы ЛС могут быть: снижение клубочковой фильтрации, нарушение секреции и реабсорбции. Также имеет значение возросшая токсичность ЛС и/или их метаболитов при нарушении функций основных систем выведения; снижение скорости элиминации вследствие нарушения метаболизма; увеличение свободной фракции ЛС в крови за счет снижения связывания с белком плазмы крови. Современные схемы антибиотикотерапии предполагают использование приемов, способствующих минимизированию нефротоксического эффекта. Необходимо как можно быстрее диагностировать ОПП для профилактики тяжелых ОПП с потребностью в гемодиализе и смертности.

2 Биомаркеры повреждения почек

На XXIII Научно-практической конференции по качественному ведению острых заболеваний (Acute Disease Quality Initiative meeting, ADQI) в 2019 году на основании анализа литературных данных (более 65000 научных статей) 23 экспертами международного класса в области интенсивной терапии, нефрологии и других смежных специальностей были приняты консенсусные мнения по биомаркерам ОПП в таких областях как:

- 1) оценка риска,
- 2) прогнозирование и предупреждение,
- 3) диагностика, этиология и лечение,

²² Клиническая фармакокинетика под редакцией акад. В.Г. Кукеса Геотар-Медиа 2009 с 145.

4) прогрессирование повреждения и восстановление почек, таблица В.2 [11].

Таблица В.2 – Классификация биомаркеров острого повреждения почек [12]

| I. Топическая классификация | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Клубочек | Альбумин, цистатин С сыворотки, альфа1-микроглобулин, бета2- микроглобулин и др. |
| 2. Проксимальный каналец | NGAL, KIM-1, L-FABP, цистатин-С мочи, IL-18 |
| 3. Дистальный каналец | GST, NGAL |
| 4. Собирательная трубка | Калибиндин D28 |
| 5. Петля Генле | Остеопонтин, NHE-3 |
| II. Патофизиологическая классификация | |
| 1. Биомаркеры почечной функции | Креатинин, цистатин С сыворотки |
| 2. Биомаркеры оксидативного стресса | 8(A2a)-изопростан, 4-ОН-2-ноненал |
| 3. Биомаркеры структурного и клеточного повреждения: - Подоцитов - Тубулоинтерстиция - Факторы экзосомальной транскрипции | Подокаликсин, нефрин NGAL, KIM-1, L-FABP АТФЗ |
| 4. Маркеры иммунного ответа | Иммуноглобулины, хемокины, компоненты комплемента |
| 5. Маркеры фиброза | TGF- β 1, CTGF, Big-H3, Коллаген IV типа |
| 6. Маркеры апоптоза | Аннексин-5 |
| III. Клиническая классификация | |
| 1. Маркер в качестве фактора риска развития ОПП | |
| 2. Маркер, использующийся при скрининге ОПП | |
| 3. Диагностический маркер, указывающий на патогенетический вариант ОПП | |
| 4. Биомаркер, стратифицирующий тяжесть процесса | |
| 5. Маркер с высокой предиктивной значимостью | |
| 6. Маркер, характеризующий ответ на терапию | |
| IV. Рабочая классификация | |
| 1. Белки, экспрессия которых повышается при ОПП | NGAL, L-FABP, KIM-1, IL-18 |
| 2. Функциональные маркеры | Цистатин С сыворотки |
| 3. Низкомолекулярные белки мочи | Цистатин С мочи, альфа1-микроглобулин, бета2-микроглобулин |
| 4. Внутриклеточные энзимы | NAG, a-GST, p-GST, ГГТП, ЩФ |

2.1 Классические маркеры ОПП

Креатинин

Для использования в клинической практике представлены в клинических рекомендациях: повышение сывороточного креатинина на 0,3 мг/дл (26,5 ммоль/л) или выше в течение 48 часов, или нарастание \geq в 1,5-1,9

раза от исходного (базального) уровня сывороточного креатинина в течение 7 дней от начала лечения, или снижение темпа диуреза до $< 0,5$ мл/кг/ч в течение 6 ч. Использование креатинина в качестве маркера ОПП имеет ряд ограничений, которые обусловлены слабой корреляцией с гломерулярной фильтрацией в динамике, особенностями его продукции в зависимости от характера питания, пола, возраста, веса, физических нагрузок и т. д., внепочечной экскрецией креатинина. Представляется важным, что креатинин – это не маркер «реального времени», его концентрация не повышается в сыворотке крови до тех пор, пока не нарушится экскреторная функция почек.

Объем выделяемой мочи, азот мочевины, экскреция натрия, микроскопия мочевого осадка

Объем выделяемой мочи очень чувствительный маркер почечной дисфункции, не используется широко в качестве диагностического критерия ОПП в связи с трудоемкостью процесса сбора мочи и оценки ее объема, частого применения диуретиков, сложностей при использовании постоянных мочевых катетеров. Другие маркеры повреждения почек, включающие азот мочевины, экскрецию натрия, микроскопию мочевого осадка, также ограничены в применении в связи с их низкой чувствительностью и специфичностью. В большинстве случаев НР в виде нефротоксичности остаются нераспознанными, так как ухудшение работы со стороны почек врачи в первую очередь связывают с течением основного заболевания и с его осложнениями, а не с применяемыми ЛП. Таким образом, актуальной научной проблемой остается поиск идеальных биомаркеров нефротоксичности для прогнозирования и мониторинга ОПП.

2.2 Биомаркеры ОПП

Биомаркер определяют как объективно измеряемый количественный индикатор биологического, патогенного процесса или фармакологического ответа на терапию [13].

Изучение применения предиктивных маркеров нефротоксичности в прогнозировании ОПП при лечении потенциально нефротоксичными АБП проводится во всем мире. В 2018 г. Food And Drug Administration (FDA) рекомендовало такие биомаркеры ОПП, как CLU, Cys C, KIM-1, NAG, NGAL и OPN в сочетании с традиционными показателями оценки нефротоксичности для выявления почечного канальцевого повреждения при диагностике ОПП в 1 фазу клинических исследований новых ЛП у здоровых добровольцев ²³. Одними из наиболее перспективных биомаркеров нефротоксичности являются такие биомаркеры, как Cys C (Цистатин С) и CLU (Кластерин).

2.3 Маркеры повреждения

Молекула почечного повреждения KIM-1 - трансмембранный гликопротеин, имеющий отделяющийся внешний домен с молекулярной массой 90 кДа, концентрацию которого можно определить в моче. Было показано, что в физиологических условиях KIM-1 практически не определяется в почечной ткани, но при воздействии различных повреждающих факторов на почку в клетках тубулярного эпителия происходит значительное повышение ее экспрессии. Предполагается, что физиологическая роль этой молекулы – участие в регенераторных процессах при повреждении эпителиальных клеток, а также в процессе фагоцитоза апоптозных телец [14]. В клинических и исследованиях на лабораторных животных было показано, что KIM-1 может выступать биомаркером ОПП, вызванного цисплатином [15], такролимусом [16], гентамицином [17] адриомицином [18] и другими ЛС. Также сообщалось о специфичности и чувствительности KIM-1 в моче при прогнозировании ОПП в кардиохирургии [19], у больных сахарным диабетом, подвергшихся чрезкожному коронарному вмешательству [20], у больных с острым

²³ <https://www.fda.gov/drugs/biomarker-qualification-program/biomarker-qualification-submissions>

коронарным синдромом после коронарографии [21] и при сердечной недостаточности [22]. КИМ-1 может использоваться для ранней диагностики ОПП, в дифференциальной диагностике прerenальной азотемии и ОКН, а также для оценки риска прогрессирования ОПП в ХБП на основании стабильного повышения его значения. [23-25]. Следует также отметить, что существуют специальные тест-полоски для определения КИМ-1 в моче, что значительно упрощает и ускоряет диагностику ОПП [26].

Липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов - NGAL - выходит в плазму из вторичных гранул активированных нейтрофилов, синтезируется в разных органах и типах клеток. NGAL человека состоит из одной полипептидной цепи, состоящей из 178 аминокислотных остатков, и имеет молекулярную массу в 22 kDa. Гликозилированная форма NGAL имеет молекулярную массу в 25 kDa. В нейтрофилах и в моче NGAL присутствует как мономер, с малым процентным содержанием димерной и тримерной форм [27]. NGAL секретируется различными клетками при инфекциях, воспалении, ишемии, неопластической пролиферации. При ОПП повышенный NGAL плазмы абсорбируется в проксимальных канальцах и в мочу не секретируется, в мочу поступает NGAL, который синтезируется в тонком восходящем отделах петли Генле и в собирательных трубках. Основная функция NGAL - стимулирование пролиферации поврежденных клеток, в особенности, эпителиальных и противодействие бактериальным инфекциям. Плазменный NGAL, поступающий в почки, спасает их от повреждений, а ренальный, синтезированный в почках и выходящий в мочу предотвращает последующую инфекцию мочевого тракта, так как NGAL обладает бактериостатическим действием, препятствуя поступлению железа в бактериальные клетки [28]. При повреждении ренальных канальцев происходит повышение уровня NGAL как в сыворотке (в 7 - 16 раз), так и в моче (в 25 - 1000 раз) [29, 30]. В клинической практике следует иметь в виду ряд ограничений по возможности использования NGAL в диагностике ОПП, поскольку концентрация сывороточного NGAL может повышаться при ХБП,

артериальной гипертензии, инфекциях, анемии, гипоксии, злокачественных новообразованиях. [31]. Клиническое применение - ранняя диагностика ОПП, локализация повреждения: канальцы и прогноз - повышение (тяжесть).

Печеночный протеин, связывающий жирные кислоты - L-FABP (liver fatty acid binding protein,) - это цитоплазматический белок с молекулярной массой 15 кДа, который экспрессируется в тканях с повышенным метаболизмом жирных кислот из семейства белков-переносчиков жирных кислот, которые участвуют в транспорте длинноцепочечных жирных кислот между интра- и экстрацеллюлярным пространством, а также регулируют оксидативный стресс, связывая липофильные продукты, ограничивая их повреждающее действие на клеточные мембраны. В организме человека синтезируется в основном в печени, но в небольших количествах обнаруживается в почках и тонком кишечнике. В нормальных условиях L-FABP отсутствует в моче, так как, фильтруясь в клубочках, затем полностью реабсорбируется в проксимальных канальцах, что позволяет диагностировать ОПП при их повреждении [32]. Было показано, что изменения L-FABP показывают ОПП, вызванное цисплатином, на 2 дня раньше изменений креатинина сыворотки [33]. Таким образом, L-FABP может использоваться как ранний маркер ОПП, связанного с повреждением дистальных канальцев.

Остеопонтин - гликопротеин, экспрессированный в канальцевых клетках и в клеточном инфильтрате интерстиция в области тубуло-интерстициального повреждения, является маркером повреждения канальцев [34].

МикроРНК (MicroRNA) - это эндогенные одноцепочечные некодирующие нуклеотиды. Более 50 микроРНК экспрессируются при ОПП, особенно при воспалении, апоптозе и фиброзе [35, 36]. Shihana с соавт. (2021), проведя анализ 754 микроРНК у пациентов, контактировавших с нефротоксическими веществами, выявили 7 микроРНК мочи, позволяющих дифференцировать тяжелое ОПП от отсутствия ОПП, из которых 4: miR-30a-3p, miR-30a-5p, miR-92a и miR-204, - показывали увеличение в > 17 раз ($p <$

0.0001). Анализ показал, что эти микроРНК связаны с регуляцией различных сигнальных путей нефротоксичности: смерти клеток, нарастающего повреждения клубочка, апоптоза, оксидативного стресса, митохондриальной дисфункции и др. Авторы рекомендуют использование этих микроРНК для ранней диагностики токсического ОПП [36].

Кальпротектин (Calprotectin) - цитозольный комплекс, связывающий кальций, из нейтрофилов и моноцитов, который определяется в моче при собственно ренальном повреждении почек. У пациентов с диагностированным ОПП при собственно почечном повреждении отмечалось повышение кальпротектина в моче, а при преренальном ОПП кальпротектин не повышался, т.е. данный маркер позволяет дифференциальную диагностику между почечным и преренальным ОПП. [37].

Хемокиновый лиганд 14 из группы СС-хемокинов (С-С motif chemokine ligand 14, CCL14) - провоспалительный хемокин, высвобождающийся в мочу при стрессе или повреждении канальцевых клеток. В многоцентровом клиническом исследовании RUBY у 364 пациентов ПИТ было показано, что CCL14 являлся более эффективным предиктором развития персистирующей ОПП 3 стадии по сравнению с такими известными маркерами как KIM-1, цистатин С плазмы и NGAL мочи [38]. Таким образом, повышение CCL14 говорит о неблагоприятном течении ОПП с тяжелым прогнозом.

Гепсидин - антимикробный пептид врожденной иммунной системы массой 2.78 kDa, производимый преимущественно гепатоцитами, который участвует в поддержании гомеостаза железа и свободно фильтруется в клубочках и практически полностью реабсорбируется. Кроме того, экспрессия гепсидина-25 отмечается на апикальной поверхности толстой нисходящей петли и собирательных трубочек, что указывает на возможность его локального синтеза и выхода в мочу. Но с соавт (2011) в гнездном исследовании случай-контроль (44 пациента после кардиохирургического вмешательства с искусственным кровообращением из 350 пациентов общей

когорты проспективного обсервационного исследования) было показано, что значительное повышение гепсидина на 1 день после хирургического вмешательства мочи было надежным предиктором не-развития ОПП ($P < 0.0005$). Таким образом гепсидин-25 может использоваться для диагностики локализации поражения и прогнозирования тяжести [39].

Глутатион-S-трансферазы (β -glutathione-S-transferase, β -GST и ρ -glutathione-S-transferase, ρ -GST) - являясь цитоплазматическими ферментами в проксимальных канальцах, ρ -GST и β -GST указывают на повреждение дистальных канальцев. В работе Kouner JL с соавт. (2010) проводилось сравнение биомаркеров ОПП (NGAL, cystatin C, KIM-1, hepatocyte growth factor (HGF), ρ -GST и β -GST) у 123 пациентов в послеоперационном периоде после кардиохирургического вмешательства. ОПП различной стадии развилось у 37,4% пациентов. Было показано, что ρ -GST была лучшим предиктором прогрессирования ОПП до 3 стадии при повышении креатинина ($AUC = 0.86$; $P = 0.002$) [40]. Может использоваться для ранней диагностики и локализации повреждения канальцев.

Хитиназа 3-подобный белок 1 мочи - UCHL3L1 (Urinary Chitinase 3-like protein 1) - внутриклеточный белок массой 39 kDa из семейства гликозидаз, экспрессирован в эндотелиальных клетках, макрофагах и нейтрофилах. De Loog с соавт. (2016) на 181 пациенте было показано, что повышение UCHL3L1 в период 12-24 часов при поступлении в ПИТ было хорошим предиктором развития ОПП ≥ 2 стадии, сходным по значимости с NGAL мочи [41].

Бета2-микроглобулин (β 2-microglobulin, β 2M) - белок с низкой молекулярной массой (11,8 кДа), после фильтрации всасывается клетками проксимального канальца. Повышение бета2-микроглобулина в моче - ранний признак повреждения канальца в том числе при воздействии нефротоксических ЛС [42], пересадке почки [43] и кардиохирургии [44]. Появление β 2M в моче является специфическим показателем повреждения канальца при нормальной или немного сниженной СКФ. К недостаткам β 2M

можно отнести его быстрый распад под влиянием протеаз мочи [45] и возможное повышение при онкологии [46].

N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза (NAG) – лизосомальный фермент, в основном определяемый в проксимальных почечных канальцах. Благодаря большой молекулярной массе (>130 кДа) исключается возможность клубочковой фильтрации NAG внепочечного происхождения. Повышение мочевого экскреции NAG отражает не только повреждение клеток, но и увеличение лизосомальной активности при сохранении их целостности [47]. Повышение активности этого фермента в моче может быть связано также с прогрессированием ХПН [48]. Повышение уровня NAG (наряду с ЩФ и ГГТ) в моче (до повышения уровня сывороточного креатинина) является высокочувствительным маркером ОПП у критически больных пациентов [49]. Недостатком определения NAG в моче в качестве биомаркера ЛПП является низкая специфичность в связи с возможностью получения ложноположительных результатов теста у больных ревматоидным артритом, с нарушением толерантности к глюкозе, у пациентов с гипертиреозом. Кроме того NAG может подавляться эндогенной мочевиной и тяжелыми металлами [50].

Моноцитарный белок-хемоаттрактант 1 - MCP-1 (Monocyte chemoattractant peptide-1) - белок экспрессируется в местах воспаления и повреждения и обеспечивает хемотаксис и адгезию макрофагов. Было показано, что дефицит MCP-1 усугубляет повреждение канальцев при ишемии/реперфузии и, таким образом, является биомаркером мононуклеарного воспаления [51]. В исследовании Moledina с соавт. с участием 972 кардиохирургических пациентов, из которых у 34% развилось ОПП, было показано, что высокое значение MCP-1 плазмы в до- и послеоперационном периоде было связано с повышенным риском развития ОПП и смерти. Авторы рекомендуют использовать MCP-1 для выявления пациентов высокого риска ОПП для проведения превентивных стратегий при планировании и проведении кардиохирургических операций [52].

Фактор роста гепатоцитов, HGF (Hepatocyte growth factor) - антифибротический цитокин мезенхимальных клеток, участвующий в регенерации канальцевых клеток при ОПП, определяется в моче, показывает повреждение канальцев [53].

Интерлейкин-18, IL-18 (Interleukin-18) - провоспалительный цитокин массой 18 kDa; продуцируется макрофагами, остеобластами, хондроцитами, эпителиальными и другими клетками, высвобождается в мочу при повреждении канальцев. ИЛ-18 способствует продукции γ -интерферона и индуцирует Т-хелперы 1 [54].

Аланинаминопепетидаза (ААП); щелочная фосфатаза (ЩФ); гамма-глутаминтрансфераза (ГГТ) - энзимы на волосках щеточной каемки проксимальных почечных канальцев, которые высвобождаются в мочу при повреждении канальцев [53].

2.4 Маркеры нарушения функции

Cys C - ингибитор цистеиновой протеазы массой 13 kDa, продуцируется ядерными клетками человека; свободно фильтруется в клубочках, реабсорбируется в эпителиальных клетках проксимальных канальцев посредством мегалин-кубулинового эндоцитоза и там полностью метаболизируется. Cys C предохраняет организм от неконтролируемого протеолиза собственных белков. Сывороточная концентрация Cys C поддерживается на постоянном уровне. Небольшая молекулярная масса и низкое сродство к другим сывороточным белкам определяют способность данной молекулы свободно фильтроваться в почечных клубочках, поступать в канальцы, где она реабсорбируется за счет мегалин-кубулин-опосредованного эндоцитоза и затем полностью метаболизируется в эпителиоцитах проксимальных канальцев, вследствие чего в норме Cys C экскретируется с мочой в минимальных количествах [55, 56]. Определение СКФ, основанной на концентрации Cys C позволяет более точно дозировать нефротоксичные ЛП и прогнозировать их элиминацию, чем по СКФ,

рассчитанную по уровню креатинина, поскольку его концентрация не зависит от возраста, пола, мышечной массы или этнической группы [57].

Концентрация Cys C в крови может повышаться при таких состояниях как применение больших доз кортикостероидов, воспаление, сахарный диабет, гипертиреозидизм, гипербилирубинемия и ревматоидный фактор [58]. Cys C в моче здоровых лиц практически не определяется и появляется при нарушении функции реабсорбции в клетках проксимальных канальцев. В экспериментах на животных моделях (крысы) концентрация Cys C в моче повышалась после введения токсической дозы гентамицина [59]. Данные клинических исследований возможности ранней диагностики ОПП по CysC мочи противоречивы: Herget-Rosenthal с соавт. у пациентов ПИТ с высоким риском развития ОПП повышение Cys C мочи отмечалось на 1-2 дня раньше изменений креатинина сыворотки и коррелировало с тяжестью ОПП [60].

Исследование Siew с соавт. смешанной группы 380 пациентов из ПИТ различных профилей (хирургия/терапия/кардиология/травма) показало отсутствие различий концентрации Cys C мочи у пациентов с ОПП и без ОПП. [61]. Большинство авторов рекомендуют исследование Cys C сыворотки для раннего определения нарушения функции почек по СКФ.

Чувствительность Cys C в отношении повреждения почек составляет 86 %, специфичность - 82 %. У 85 пациентов с высоким риском развития ОПП увеличение сывороточной концентрации Cys C происходило раньше на 24-48 часов, чем повышался уровень креатинина [62]. При обследовании пациентов после кардиохирургических вмешательств, Cys C в сыворотке был чувствительным маркером ОПП и позволял оценивать относительный риск летального исхода и прогнозировать потребность в гемодиализе [63]. Концентрация Cys C в плазме крови наряду с креатинином служит основой для расчетного определения СКФ по наиболее точной и современной формуле СКД - EPI 2009 [64]. Cys C является альтернативным креатинину маркером почечного повреждения, так как его концентрация в крови не зависит от возраста, пола, диеты или воспаления. По данным метаанализа

клинических исследований, проведенных к 2017 году, определение СКФ, основанной на концентрации Cys C, позволяло более точно дозировать нефротоксичные ЛП и прогнозировать их элиминацию, чем по СКФ, рассчитанную по уровню креатинина [56]. Это особенно оправдано у лиц с очень низким уровнем сывороточного креатинина (старческий и детский возраст). Концентрация Cys C в крови может повышаться при таких состояниях, как: применение больших доз кортикостероидов, воспаление, сахарный диабет, гипертиреозидизм, гипербилирубинемия. Он синтезируется во многих тканях, обнаруживается во многих физиологических жидкостях, таких, как плазма, семенная и цереброспинальная жидкость [11, 57].

CLU — гликопротеин, имеющий молекулярную массу 70–80 кДа, синтезируется во многих тканях и обнаруживается во многих физиологических жидкостях, таких как плазма, цереброспинальная и семенная жидкость. CLU участвует в регуляции активности комплемента, защите клеток от стресса, транспорте липидов, созревании спермы. Продукция CLU повышается на ранних стадиях органогенеза и после повреждения тканей, а также при гипертиреозидизме [65]. Концентрация CLU в моче повышается из-за стимуляции его синтеза в ответ на ОПП преимущественно на уровне дистальных почечных канальцев. CLU хорошо себя зарекомендовал в качестве чувствительного маркера ОПП. По данным исследований на животных моделях, уровень CLU достоверно повышался в моче в ответ на введение препарата железа (венофер), контрастных веществ, сахарозы, маннитола, высоких доз гипертонического раствора [66]. Также отмечалось повышение CLU у людей [67] и у собак [68] при отравлении ядом гадюки CLU был использован в качестве биомаркера при диагностике ЛПП в исследовании по сравнению профиля безопасности ванкомицина и комбинации ванкомицина с препаратом пиперацилин+тазобактам у крыс [69].

2.5 Биомаркеры и локализация нарушений

Связь локальной экспрессии биомаркеров с механизмом и непосредственным местом повреждения в некоторых случаях позволяет детализировать локализацию повреждения. Несмотря на некоторую противоречивость данных, большинство авторов признает легитимность связи конкретных биомаркеров с локализацией почечного повреждения.

На нарушение клубочковой фильтрации указывает изменение СКФ, определяемое по цистатину и/или креатинину, а также NGAL и β -микроглобулин сыворотки. На повреждение клубочка указывают появление в моче альбумина и Cys C. Повреждение проксимальных канальцев можно определить по мочевым ИЛ-18, KIM-1, L-FABP, TIMP2/IGFBP7, NAG, β 2- и α 1-микроглобулинам. На изменения в дистальных канальцах также указывает NGAL мочи [70].

Согласно рекомендациям от 2020 года по острому повреждению почек для прогнозирования развития ОПП у пациентов с наличием факторов риска, которым планируется проведение медицинской процедуры, потенциально способной спровоцировать развитие данного состояния (например, оперативное вмешательство, рентгеноконтрастное исследование и др.) исследовать базальные уровни биомаркеров повреждения почек и оценивать их динамику в течение 48 часов [20-22, 26, 32-36].

Проанализировав литературные источники о маркерах нефротоксичности, мы составили таблицу известных маркеров с основными характеристиками, такими как: при каких поражениях почек могут быть обнаружены, в каком отделе нефрона выделяются, каким методом определяются в клинико-диагностических лабораториях, приведены возможные ЛС, при применении которых было отмечено повышение концентрации искомого биомаркера, а также наличие сертификации регуляторными органами (Приложение 1).

2.6 Изучение возможности применения предиктивных маркеров нефротоксичности (Cystatin C, Clusterin) в прогнозировании нефротоксичности ванкомицина

На первом этапе исследования нами была изучена частота назначения ванкомицина пациентам в реанимационных отделениях городской клинической больницы в 2020 г., таблица В.3. Большинство из этих больных имели септические осложнения, лечение которых осуществлялось в полном объеме в соответствии с Национальными рекомендациями по лечению сепсиса 2017 года.

Таблица В.3 – Частота назначения ванкомицина пациентам реанимационных отделений городской клинической больницы в 2020 г

| Реанимационные отделения | Всего лечилось пациентов чел. | Из них пациентов, получавших ванкомицин | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------|-----|
| | | чел. | % |
| Реанимационное отделение для больных хирургического профиля | 752 | 158 | 21% |
| Отделение реанимации и интенсивной терапии для больных терапевтического профиля | 272 | 68 | 25% |
| Отделение реанимации и интенсивной терапии для больных с коронавирусной инфекцией | 238 | 76 | 32% |
| Отделение анестезиологии и реанимации кардиохирургического отделения | 220 | 88 | 40% |
| Палата интенсивной терапии отделения нарушений мозгового кровообращения | 1336 | 120 | 9% |
| Блок кардиореанимации | 2967 | 237 | 8% |
| Всего | 5785 | 747 | 13% |

По данным, приведенным в таблице В.3, ванкомицин использовали при лечении 13% пациентов, находившихся в реанимационных отделениях больницы в 2020 г. (как правило, в сочетании с другими антибиотиками). Чаще всего препарат назначали в отделениях анестезиологии и реанимации кардиохирургического профиля – 40% случаев, реанимации и интенсивной терапии для больных с коронавирусной инфекцией – 32%, в отделении реанимации и интенсивной терапии для больных терапевтического профиля – 25% и в реанимационном отделении для больных хирургического профиля

– 21%. В нейрореанимации и кардиореанимации ванкомицин применяли гораздо реже (9% и 8% случаев соответственно), причем в этих отделениях в основном его назначали в виде раствора для перорального применения при лечении псевдомембранозного колита, вызванного *Clostridium difficile*

На втором этапе провели относительное изменение концентрации маркеров ОПП кластерина и цистатина С в плазме крови 36 пациентов с внебольничными инфекциями нижних дыхательных путей через 1 час и через 7 часов после внутривенного введения ванкомицина.

Мы проанализировали реальную клиническую практику многопрофильной высоко технологичной больницы, когда у пациентов перед назначением ванкомицина определяли креатинин, подбирали дозу ванкомицина исходя из СКФ и далее проводили ТЛМ концентрации ЛС в крови, т.е. пытались предупредить развитие нефротоксичности, что не всегда удавалось. С целью определения времени начала и длительности токсического действия ванкомицина определяли концентрацию маркера ОПП кластерина в плазме крови (методика проведения описана в Приложении 2). Через 1 час после внутривенного введения ЛС концентрация кластерина была выше референсных значений. Через 7 часов значения возвращались к нормальным цифрам и были достоверно ниже ($p= 0,0078$), чем через 1 час.

С целью определения времени начала и длительности токсического действия ванкомицина определяли концентрацию маркера ОПП цистатина С в плазме крови (методика проведения описана в Приложении 3). Через один 1 час после внутривенного введения ЛС концентрация цистатина С была в пределах нормальных значений, а через 7 часов превышали таковые и оказались достоверно выше ($p= 0,054$), чем через 1 час.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нежелательные реакции антимикробных препаратов остаются наиболее актуальным аспектом безопасности фармакотерапии и остаются важным направлением изучения и исследования. Сложность проводимых исследований связана с особенностями химической природой препаратов, класс-специфическими эффектами препаратов и различиями в патогенезе поражения различных органов и систем разными классами ЛС. Наиболее тяжелые повреждения отмечаются при применении антимикробных препаратов классов бета-лактамов, аминогликозидов, и представителя гликопептидов-ванкомицина. Факторами риска развития патологии на фоне применения АБП являются индивидуальные особенности пациента (пол, возраст, масса тела, генетическая предрасположенность к поражению, аллергические реакции в анамнезе), а также наличие заболеваний или состояний (верифицированные болезни почек, сахарный диабет, гиповолемия), прием иАПФ, БРА, НПВП или их комбинации. Маркеры должны быть специфичными, высоко чувствительными и работать на ранней, доклинической стадии ОПП. Новые Маркеры ОПП характеризуют большинство патологических процессов нефрона. Поражение дистальных канальцев отражают GST, NGAL, проксимальных- NGAL, KIM-1, L-FABP, Cys C мочи, IL-18, Петли Генле - Остеопонтин, NHE-3, собирательной трубки - калибиндин D28. Концентрация NGAL, L-FABP, KIM-1, IL-18 повышается при ОПП. Внедрены в клиническую практику Cys C сыворотки и мочи, альфа1-микроглобулин, β -2-микроглобулин. Иммуноглобулины, хемокины, компоненты комплемента являются маркерами иммунного ответа, что имеет значение в дифференциальной диагностике аллергических и неаллергических механизмов поражения. 8(A2a)-изопростан, 4-ОН-2-ноненал являются биомаркерами оксидативного стресса. Биомаркерами структурного и клеточного повреждения являются подокаликсин, нефрин NGAL, KIM-1, L-FABP АТФ3. К маркерам фиброза относятся TGF- β 1, CTGF, Big-H3, Коллаген IV типа, маркером апоптоза является Аннексин-5.

Внутриклеточные ферменты NAG, α -GST, ρ -GST, ГТП, ЩФ частично представлены в клинической практике.

Механизмы развития при повреждении различных сегментов нефрона могут в значительной степени сочетаться, что делает актуальным определение патогенетических вариантов ОПП, а также особое значение и перспективу приобретает изучение специфичности, диагностических критериев и внедрение линеек маркеров ОПП и НР при проведении антимикробной терапии.

Таким образом, при выборе биомаркеров нефротоксичности при применении антимикробных препаратов, в том числе при внебольничных инфекциях нижних дыхательных путей рекомендовано следующее:

1) KIM-1 – предпочтительно контролировать для оценки нефротоксичности при назначении аминогликозидов, используя референсные значения в соответствии с Приложением 1. Методика анализа описана в Приложении 4,

2) Cystatin C – ассоциирован с применением карбапенемов и цефалоспоринов., что диктует необходимость контроля данного маркера для прогнозирования нефротоксичности данных ЛС (референсные значения указаны в Приложении 1). Методика анализа описана в Приложении 3,

3) Clusterin – целесообразно определять при применении ванкомицина как наиболее быстро реагирующий маркер нефротоксичности (референсные значения указаны в Приложении 1). Методика анализа описана в Приложении 2,

4) Cystatin C является альтернативным креатинину маркером почечного повреждения, так как его концентрация в крови не зависит от возраста, пола, диеты или воспаления,

5) Для более точного дозирования нефротоксичных ЛП и прогнозирования их элиминации целесообразно рассчитывать СКФ по концентрации Cystatin C, по формуле, указанной в инструкции к конкретному диагностическому набору для определения цистатина C,

наиболее пригодной для расчета СКФ при использовании данного метода измерения,

б) Необходимо учитывать, что использования NGAL как маркера нефротоксичности ЛП в клинической практике имеет ряд ограничений, поскольку концентрация сывороточного NGAL может повышаться при инфекциях, включая внебольничную пневмонию, ХБП, артериальной гипертензии, инфекциях, анемии, гипоксии, злокачественных новообразованиях.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Rolland A.L., Garnier A.S., Meunier K, Drablier G, Briet M. Drug-Induced Acute Kidney Injury: A Study from the French Medical Administrative and the French National Pharmacovigilance Databases Using Capture-Recapture Method. // J Clin Med. - 2021. - 10(2). 168.
2. Xu X, Nie S, Liu Z, et al. Epidemiology and clinical correlates of AKI in Chinese hospitalized adults // Clin J Am Soc Nephrol. - 2015. -10(9). P. 1510-1518.
3. Wang Y, Cui Z, Fan M. Hospital-acquired and community-acquired acute renal failure in hospitalized Chinese: a ten-year review // Ren Fail. - 2007. - 29(2). P. 163-168.
4. Liu C, Yan S, Wang Y, et al. Drug-Induced Hospital-Acquired Acute Kidney Injury in China: A Multicenter Cross-Sectional Survey // Kidney Dis (Basel). - 2021. - 7(2) P. 143-155.
5. Tomono K. Association of Adverse Drug Events with Broad-spectrum Antibiotic Use in Hospitalized Patients: A Single-center Study // Intern Med. - 2019. - 15. 58(18). P. 2621-2625.
6. Козлов К.Л., Смольников А.В., Лукьянов Н.Г., и др. Контраст-индуцированная нефропатия // Учебно-методическое пособие. Под ред.: А.Н. Бельских, Г.Г. Хубулавы. - СПб: ВМедА. - 2017. 40 с.
7. Mody H, Ramakrishnan V, Chaar M, et al. A Review on Drug-Induced Nephrotoxicity: Pathophysiological Mechanisms, Drug Classes, Clinical Management, and Recent Advances in Mathematical Modeling and Simulation Approaches // Clin Pharmacol Drug Dev. - 2020. - Vol. 9. No 8. P. 896-909.
8. Schunk S.J., Zarbock A, Meersch M, et al. Association between urinary dickkopf-3, acute kidney injury, and subsequent loss of kidney function in patients undergoing cardiac surgery: an observational cohort study // Lancet. - 2019. - 394(10197). P. 488-496.
9. Yang L, Xing G, Wang L, et al. Acute kidney injury in China: a cross-sectional survey // Lancet (London, England). - 2015. - 386(10002). P. 1465-1471.

10. Tamma P.D., Avdic E., Li D.X., et al Association of Adverse Events With Antibiotic Use in Hospitalized Patients // JAMA Intern Med. - 2017. - Vol. 177. No. 9. P. 1308-1315.

11. Ostermann M, Zarbock A, Goldstein S, et al. Recommendations on Acute Kidney Injury Biomarkers From the Acute Disease Quality Initiative Consensus Conference: A Consensus Statement // JAMA Netw Open. - 2020. - 3(10). P. e2019209.

12. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and metaanalysis // Am J Kidney Dis. - 2009; - 54 (4). P. 1012-1024.

13. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin. Pharmacol. Ther. - 2001; 69(3): 89-95

14. Ichimura T, Brooks C.R., Bonventre J.V. Kim-1/ Tim-1 and immune cells: Shifting sands // Kidney Int. - 2012. - 81. P. 809-811.

15. Shinke H, Masuda S, Togashi Y, et al. Urinary kidney injury molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 are noninvasive biomarkers of cisplatin-induced nephrotoxicity in lung cancer patients // Cancer Chemother Pharmacol. - 2015. - No. 76. P. 989-996.

16. Cosner D, Zeng X, Zhang P.L. Proximal Tubular Injury in Medullary Rays is an Early Sign of Acute Tacrolimus Nephrotoxicity // Journal of Transplantation. - 2015. - No. 6. P. 142521.

17. Luo Q.H., Chen M.L., Sun F.J., et al. KIM-1 and NGAL as biomarkers of nephrotoxicity induced by gentamicin in rats // Mol Cell Biochem. - 2014. - Vol. 397. No. 1-2. P. 53-60.

18. Kramer A.B., van Timmeren M.M., Schuurs T.A., et al. Reduction of proteinuria in adriamycin-induced nephropathy is associated with reduction of renal kidney injury molecule (Kim-1) over time // Am J Physiol Renal Physiol. - 2009. - Vol. 296. No. 5. P. F1136-F1145.

19. Ho J., Tangri N., Komenda P., et al. Plasma, and Serum Biomarkers' Utility for Predicting Acute Kidney Injury Associated With Cardiac Surgery in Adults: A Meta-analysis // *Am J Kidney Dis.* - 2015. - Vol. 66. No. 6. P. 993-1005.
20. Li W, Yu Y, He H, Chen J, Zhang D. Urinary kidney injury molecule-1 as an early indicator to predict contrast-induced acute kidney injury in patients with diabetes mellitus undergoing percutaneous coronary intervention // *Biomedical Reports.* - 2015. - Vol. 3. No. 4. P. 509-512.
21. Torregrosa I, Montoliu C, Urios A., et al. Urinary KIM-1, NGAL and L-FABP for the diagnosis of AKI in patients with acute coronary syndrome or heart failure undergoing coronary angiography // *Heart Vessels.* - 2015. - Vol. 30. No. 6. P. 703-711.
22. Yang C.H., Chang C.H., Chen T.H., et al. Combination of Urinary Biomarkers Improves Early Detection of Acute Kidney Injury in Patients With Heart Failure // *Circ J.* - 2016. - Vol. 80. No. 4. P. 1017-1023.
23. Lim A.I., Tang S.C., Lai K.N., Leung J.C. Kidney injury molecule-1: More than just an injury marker of tubular epithelial cells? // *J. Cell. Physiol.* - 2013, - 228. P. 917-924.
24. Kadioglu T, Uzunlulu M, Yigit Kaya S, et al. Urinary kidney injury molecule-1 levels as a marker of early kidney injury in hypertensive patients // *Minerva Urol. Nefrol.* - 2016. - 68. P. 456-461.
25. Sabbisetti V.S., Waikar S.S., Antoine D.J., et al. Blood kidney injury molecule-1 is a biomarker of acute and chronic kidney injury and predicts progression to ESRD in type I diabetes // *J. Am. Soc. Nephrol.* - 2014. - 25. P. 2177-2186.
26. Vaidya V.S., Ford G.M., Waikar S.S., et al. A rapid urine test for early detection of kidney injury // *Kidney Int.* - 2009. - 76(1). P. 108-114.
27. Kjeldsen L., Johnsen A.H., Sengeløv H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase // *J Biol Chem.* - 1993. - Vol. 268. No. 14. P. 10425-10432.

28. Schmidt-Ott K.M., Mori K., Li J.Y., et al. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin // *J Am Soc Nephrol.* - 2007. - Vol. 18. No. 2. P. 407-413.
29. Wagener G., Jan M., Kim M., et al. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery // *Anesthesiology.* - 2006. - Vol. 105. No. 3. P. 485-491.
30. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery // *Lancet.* - 2005. - Vol. 365. No. 9466. P. 1231-1238.
31. Nielsen B.S., Borregaard N., Bundgaard J.R., et al. Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases // *Gut.* - 1996. - Vol. 38. No. 3. P. 414-420.
32. Xu Y, Xie Y, Shao X, Ni Z, Mou S. L-FABP: A novel biomarker of kidney disease // *Clin Chim Acta.* - 2015. - 20. P. 85-90.
33. Yanishi M, Kinoshita H. Urinary L-type fatty acid-binding protein is a predictor of cisplatin-induced acute kidney injury // *BMC Nephrol.* - 2022. - 23. P. 125.
34. Lorenzen J.M., Hafer C, Faulhaber-Walter R, et al. Osteopontin predicts survival in critically ill patients with acute kidney injury // *Nephrol Dial Transplant.* - 2011. - 26(2). P. 531-537.
35. Fan P.C., Chen C.C., Peng C.C., et al. A circulating miRNA signature for early diagnosis of acute kidney injury following acutemyocardial infarction // *J Transl Med.* - 2019. - 17(1). P. 139.
36. Shihana F, Wong W.K.M., Joglekar M.V., et al. Urinary microRNAs as non-invasive biomarkers for toxic acute kidney injury in humans // *Sci Rep.* - 2021. - 11(1). P. 9165.
37. Heller F, Frischmann S, Grunbaum M, Zidek W, Westhoff T.H. Urinary calprotectin and the distinction between prerenal and intrinsic acute kidney injury // *Clin J Am Soc Nephrol.* - 2011. - 6(10). P. 2347-2355.

38. Hoste E, Bihorac A, Al-Khafaji A, et al. RUBY Investigators. Identification and validation of biomarkers of persistent acute kidney injury: the RUBY study // *Intensive Care Med.* - 2020. - 46(5). P. 943-953.
39. Ho J, Reslerova M, Gali B, et al. Urinary hepcidin-25 and risk of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass // *Clin J Am Soc Nephrol.* - 2011. - 6(10). P. 2340-2346.
40. Koyner J.L., Vaidya V.S., Bennett M.R., et al. Urinary biomarkers in the clinical prognosis and early detection of acute kidney injury // *Clin J Am Soc Nephrol.* - 2010. - 5(12). P. 2154-2165.
41. De Loor J, Decruyenaere J, Demeyere K, et al. Urinary chitinase 3-like protein 1 for early diagnosis of acute kidney injury: a prospective cohort study in adult critically ill patients // *Crit Care.* - 2016. - 20. P. 38.
42. Tengstrand E, Zhang H, Liu N, Dunn K, Hsieh F, A multiplexed UPLCMS/MS assay for the simultaneous measurement of urinary safety biomarkers of drug-induced kidney injury and phospholipidosis // *Toxicol Appl Pharmacol.* - 2019. -366. P. 54-63.
43. Garcia-Garcia E., Martin-Izquierdo C.M., de Basoa A, et al. Urinary Clara Cell Protein in Kidney Transplant Patients: A Preliminary Study // *Transplant Proc.* - 2016. - 48(9). P. 2884-2887.
44. Zaleska-Kociecka M, Skrobisz A, Wojtkowska I, et al. Serum beta-2 microglobulin levels for predicting acute kidney injury complicating aortic valve replacement // *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* - 2017. - 25(4). P. 533-540.
45. Yamamoto H, Yamada T, Itoh Y. Probable involvement of cathepsin D in the degradation of beta2-microglobulin in acidic urine // *Clin Chem Lab Med.* - 2000. - 38(6). P. 495-499.
46. Jones B.R., Bhalla R.B., Mladek J, et al. Comparison of methods of evaluating nephrotoxicity of cis-platinum // *Clin Pharmacol Ther.* - 1980. - 27(4). P. 557-562.

47. Geus H, Betjes M, Bakker J. Biomarkers for the prediction of acute kidney injury: a narrative review on current status and future challenges // Clin Kidney J. - 2012. - Vol. 5. No. 2. P. 102-108.

48. Hsu C.Y., Xie D., Waikar S.S., et al. Urine biomarkers of tubular injury do not improve on the clinical model predicting chronic kidney disease progression // Kidney Int. - 2017. - Vol. 91. No. 1. P. 196-203.

49. 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. - Vol. 18. No. 3. P. 543-551.

50. Tajima S, Yamamoto N, Masuda S. Clinical prospects of biomarkers for the early detection and/or prediction of organ injury associated with pharmacotherapy // Biochemical Pharmacology. - 2019. - No. 170. P. 113664.

51. Stroo I, Claessen N, Teske G.J., et al. Deficiency for the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 aggravates tubular damage after renal ischemia/reperfusion injury // PLoS One. - 2015. - 10(4). P. e0123203.

52. Moledina D.G., Isguven S, McArthur E, et al. Translational Research Investigating Biomarker Endpoints in Acute Kidney Injury (TRIBE-AKI) Consortium. Plasma monocyte chemotactic protein-1 is associated with acute kidney injury and death after cardiac operations // Ann Thorac Surg. - 2017. - 104(2). P. 613-620.

53. Coca S.G., Yalavarthy R, Concato J, Parikh C.R. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review // Kidney Int. – 2008. -73(9). P. 1008-1016.

54. Wu H, Craft M.L., Wang P, et al. IL-18 contributes to renal damage after ischemia-reperfusion // J Am Soc Nephrol. - 2008. - 19. P. 2331-2341.

55. Клинические рекомендации. Острое повреждение почек (ОПП). Кодирование по Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем: N17. Возрастная группа: Взрослые. Год утверждения: 2020 (пересмотр каждые 3 года). 142 с.

56. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury // JAm Soc Nephrol. - 2016. - 17(6). P. 1503-1520.
57. Barreto E.F., Rule A.D., Murad M.H., et al. Prediction of the Renal Elimination of Drugs With Cystatin C vs Creatinine: A Systematic Review // Mayo Clin Proc. - 2019. - Vol. 94. № 3. P. 500-514.
58. Bokenkamp A, van Wijk J.A., Lentze M.J., Stoffel-Wagner B. Effect of corticosteroid therapy on serum cystatin C and beta2-microglobulin concentrations // Clin Chem. - 2002. - Vol. 48. № 7. P. 1123-1126.
59. Udupa V, Prakash V. Gentamicin induced acute renal damage and its evaluation using urinary biomarkers in rats // Toxicol Rep. - 2019. - No. 6. P. 91-99.
60. Herget-Rosenthal S, van Wijk J.A., Bröcker-Preuss M, Bökenkamp A. Increased urinary cystatin C reflects structural and functional renal tubular impairment independent of glomerular filtration rate // Clin Biochem. - 2007. - 40(13-14). P. 946-951.
61. Siew E.D., Ware L.B., Bian A, et al. Distinct injury markers for the early detection and prognosis of incident acute kidney injury in critically ill adults with preserved kidney function // Kidney Int. - 2013. - 84(4). P. 786-794.
62. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: new paths for an old shuttle // Cancer Ther. - 2007. - 5 (B). P. 463-470.
63. Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion // Kidney Int. - 2003. - 63(5). P. 1714.
64. Uchino S, Doig G.S., Bellomo R. Diuretics and mortality in acute renal failure // Crit Care Med. – 2004. - 32 (5). P. 1669-1677.
65. Masood A, Benabdelkamel H, Ekhzaimy A, Alfadda A. Plasma-based proteomics profiling of patients with hyperthyroidism after antithyroid treatment. Molecules. - 2020. - 25(12). P. 2831.
66. Kohl K, Herzog E, Dickneite G, Pestel S. Evaluation of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury in a rat nephropathy model // J Pharmacol Toxicol Methods. - 2020. - 105. P. 106901.

67. Ratnayake I, Mohamed F, Buckley N.A., et al. Early identification of acute kidney injury in Russell's viper (*Daboia russelii*) envenoming using renal biomarkers. // *PLoS Negl Trop Dis.* - 2019. - 13(7). P. e0007486.
68. Gordin E, Gordin D, Viitanen S, et al. Urinary clusterin and cystatin B as biomarkers of tubular injury in dogs following envenomation by the European adder // *Res Vet Sci.* - 2021. - 134. P. 12-18.
69. Da Y, Akalya K, Murali T, et al. Serial quantification of urinary protein biomarkers to predict druginduced acute kidney injury // *Curr Drug Metab.* - 2019. - 20(8). P. 656-664.
70. Antonelli A, Allinovi M, Cocci A, et al. The Predictive Role of Biomarkers for the Detection of Acute Kidney Injury After Partial or Radical Nephrectomy: A Systematic Review of the Literature // *Eur Urol Focus.* - 2020. - 6(2). P. 344-353.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица – Характеристики биомаркеров нефротоксичности

| Название | Сегмент нефрона | Показатели в клинике | Метод определения | Патологический процесс | ЛС, с применением которых ассоциирован данный биомаркер | Сертификация регуляторами (FDA, EMA) для и использования в клинике |
|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| КИМ-1 (молекула повреждения почек) | Клубочки и проксимальные каналцы | 60-837 пк/мл (моча) | ИФА | Острое повреждение почек (ОПП), хроническая болезнь почек (ХБП), трансплантация почки | Аминогликозидные антибиотики, амфотерицин В, адефовир, цисплатина | + |
| Цистатин-С | Клубочки и проксимальные каналцы | 0.78 ± 0.2 мг/л для женщин; 0.86 ± 0.155 мг/л для мужчин (сыворотка) | ИФА | ОПП, ХБП | Цисплатин, карбапенемы, цефалоспорины | + |
| Альфа-1 микроглобулин | Клубочки и проксимальные каналцы | 20 - 42 мг/л (сыворотка); 3.5 -- 8 мг/л (моча) | ИФА | ОПП, ХБП | | |
| Альфа-2 микроглобулин (RBP) | проксимальные каналцы | | | | | |

Продолжение таблицы

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----|----------------------|-------------------------|---|
| Бета2-микроглобулин | Клубочки и проксимальные каналцы | 0.7-1.8 мкг/л (сыворотка) | ПФА | ОПП, ХБП | | |
| кластерин | Клубочки и проксимальные каналцы | 61.0 ± 11.4 мг/л (сыворотка) | ПФА | ОПП, ХБП | | + |
| Трефоил фактор 3 | Проксимальные и дистальные каналцы | 230.7 ± 46.9 пг/мл (сыворотка) | | ОПП, ХБП | | + |
| Липокалин, ассоциированный с нейтрофильной желатиназой (NGAL) | Проксимальные и дистальные каналцы | 18.9 -- 46.5 мкг/л (сыворотка) and 2.1 -- 9.6 мкг/л (моча) | ПФА | ОПП, ХБП | Цисплатин, оксалиплатин | + |
| N-ацетил-бета-d-глюкозоамидаза (NAG) | проксимальные каналцы | < 7 ед/л (моча) | ПФА | ОПП | | |
| Лактатдегидрогеназа (LDH) | Проксимальные и дистальные каналцы | < 230 ед/л (сыворотка) | ПФА | ОПП, ХБП | | |
| Щелочная фосфатаза | Проксимальные и дистальные каналцы | 25 -- 160 ед/л (сыворотка) | | ОПП, ХБП | | |
| Гамма-глутамил транспептидаза | проксимальные каналцы | 9 -- 50 ед/л (сыворотка) | ПФА | ОПП, ХБП | | |
| Глутатион-S-трансфераза альфа (GST-a) | проксимальные каналцы | < 10 нг/10 ммоль креатинина (моча) [119] | | ОПП | | |
| Пнтерлейкин-6 | проксимальные каналцы | < 5.9 пк/мл (сыворотка) | ПФА | ОПП, пересадка почки | | |
| Пнтерлейкин-8 | проксимальные каналцы | < 8.7 пк/мл (сыворотка) | ПФА | ОПП, пересадка почки | | |

Продолжение таблицы

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------------|-----------|---|
| Интерлейкин-18 | проксимальные каналы | 160 -- 470 пг/мл (сыворотка) | ИФА | ОПП | | |
| Колонистимулирующий фактор 1 (M-CSF) | проксимальные каналы | < 500 пк/мл (сыворотка) | ИФА | ОПП | | |
| TNF-а | проксимальные каналы | < 0.7 пк/мл (сыворотка) | | ОПП, пересадка почки | | |
| (L-FABP) | проксимальные каналы | 8.54 (7.14 -- 11.06) мкг/л для женщин; 9.87 (8.9 -- 12.13) мкг/л для мужчин | ИФА | ОПП, ХБП | | |
| Остеопонтин | Проксимальные и дистальные каналы | < 820 нг/мл (сыворотка) | ИФА | ОПП, пересадка почки | | |
| Тканевой ингибитор металлопротеазы-2 (TIMP-2) | Проксимальные каналы | | | | | |
| Инсулиноподобный связывающий фактор роста 7 (IGFBP7) | Проксимальные каналы | | | | | |
| Миоинозитолоксигеназа (MIOX) | Проксимальные каналы | 0.5 ± 0.3 нг/мл | | | цисплатин | |
| Гемоксигеназа-1 (НО-1) | Проксимальные каналы | | | | | |

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Методика определения Кластерина

Материал для анализа – плазма крови, взятой у пациентов, получающих ванкомицин, для ТЛМ через 1 час и 7 часов после введения АБП.

Количественное определение кластерина проводилось методом ИФА с использованием лабораторного набора Human Clusterin ELISA Kit, производитель Abcam, каталожный номер ab174447.

Все компоненты должны быть комнатной температуры

Подготовка реагентов:

- 1) Плазма крови. Разведение в буфере для разведения образцов (NS) в соотношении 1:50000,
- 2) Промывочный буфер (PT): растворяем в деионизованной воде в соотношении 1:10. Приготавливаем 50 мл буфера,
- 3) Антитела к кластерину: растворяют в соотношении 1:10 в растворителе 4BR,
- 4) Стандарт кластерина: растворяют путем прибавления 1мл буфера для разведения образцов (NS-буфер). Не пипетировать! Дать постоять 10-15 ми до полного растворения. При этом получается раствор кластерина с концентрацией 100 000пг/мл. Далее проводим серию разведений стандарта: для этого приготавливаем 8 пробирок и нумеруем их 1, 2,...8. В первую добавляем 255мкл NS-буфера, а в остальные по 150мкл NS-буфера. Из стокового раствора кластерина добавляем 45мкл в пробирку 1, в результате получаем 300мкл раствора с концентрацией 15000пк/мл. Далее из пробирки один отбираем 150мкл раствора в пробирку 2, затем из пробирки 2 отбираем 150мкл раствора в пробирку 3 и так далее до пробирки 7, в пробирке 8 остается чистый буфер. Разведения указаны в таблице 1.

Таблица 1 – Разведения стандарта

| N | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--------------------------------|-------|------|------|------|-------|-------|-------|---|
| Концентрация кластерина, пк/мл | 15000 | 7500 | 3750 | 1875 | 937,5 | 468,8 | 234,4 | 0 |

Процедура анализа:

- 1) Брали необходимое количество стрипов для анализа,
- 2) Добавляли по 50мкл стандартов и образцов нужные лунки,
- 3) Добавляли по 50мкл раствора антител в каждую лунку,
- 4) Запечатывали планшет пленкой и инкубируют 60мин при комнатной температуре в шейкере при 400 об/мин,
- 5) Промывали каждую лунку 3 раза по 350мкл промывочного буфера, промывание осуществляют путем аспирации или декантации. На каждой стадии промывки буфер находился в лунках не менее 30 сек, после последней промывки удаляли остатки буфера постукиванием по чистой фильтровальной бумаге для удаления остатков буфера,
- 6) В каждую лунку добавляли 100мкл проявляющего раствора (ТМВ) и инкубировали 10мин в шейкере при 400об/мин в темноте,
- 7) В каждую лунку добавляли 100мкл стоп-раствора и встряхивали на шейкере 1мин
- 8) Помещали планшет в ридер «Biotek» и проводили измерение оптической плотности при длине волны 450 нм в режиме считывания endpoint.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Методика определения Цистатина С

Материал для анализа – плазма крови, взятой у пациентов, получающих ванкомицин, для ТЛМ через 1 час и 7 часов после введения АБП.

Определение цистатина проводилось с использованием лабораторного набора Human Cystatin ELISA Kit, производитель Abcam, каталожный номер ab119589.

Все компоненты должны быть комнатной температуры.

Подготовка реагентов:

1) Антитела к цистатину С. Растворяли в буфере для антител в соотношении 1:100 и тщательно перемешивали,

2) Комплекс авидин-биотин. Перед растворением откручивали на центрифуге для сбора капель со стенок пробирки. Растворение проводили в АВС-буфере в соотношении 1:100 и тщательно перемешивали,

3) Фосфатный буфер. Использовали dPBS-буфер от Gibco,

4) Стандартные растворы. Приготавливали путем разведения известной массы цистатина С – 20нг в буфере для разведения образцов. Растворение производилось непосредственно перед использованием (не раньше, чем за 2 часа перед экспериментом):

- в пробирку с 20нг цистатина С добавляли 1мл буфера для разведения образцов и оставляли при комнатной температуре на 10мин для растворения. В результате получали раствор с концентрацией 20000пк/мл (сток);

- пронумеровали семь пробирок от 1 до 7. В каждую добавили по 300мкл буфера для разведения образцов;

- в пробирку 1 добавили 300мкл раствора стока и тщательно перемешали;

- из пробирки 1 отбирали 300мкл раствора и переносили в пробирку 2 и осторожно перемешивали, затем из пробирки 2 переносили 300мкл в пробирку 3 и так далее до пробирки 6. В итоге получили следующую серию концентраций, таблица 1.

Таблица 1 – Серия концентраций

| № | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------|-------|------|------|------|-----|-------|---|
| С, пк/мл | 10000 | 5000 | 2500 | 1250 | 625 | 312,5 | 0 |

5) Приготовление образцов. Растворяли в буфере для разведения образцов в соотношении 1:10.

Протокол анализа:

1) Отобрать необходимое количество стрипов для анализа,
2) Добавить в лунки по 100 мкл стандартных образцов и исследуемых образцов,

3) Запечатать лунки пленкой и инкубировать 90мин при 37°C,

4) Убрали пленку, удалили содержимое из лунок, затем в каждую лунку добавили по 100мкл раствора антител к цистатину С, запечатали новой пленкой и инкубировали 60мин при 37°C,

5) Удаляли пленку и промывали три раза по 300мкл dPBS-буфером, каждый раз оставляли буфер в лунке не менее 1 минуты, удаляли остатки буфера после каждого этапа промывки постукиванием о фильтровальную бумагу,

6) Добавляли в каждую лунку по 100 мкл авидин-биотин-пероксидазного комплекса, запечатывали новой пленкой и инкубировали 30мин при 37°C,

7) Промывали лунки dPBS-буфером 5 раз по 300мкл, после промывки остатки буфера удаляли постукиванием по фильтровальной бумаге,

8) Добавляли в каждую лунку по 90мкл ТМВ-буфера и инкубировали 15-20мин при 37°C. Должно быть видно на глаз посинение раствора в лунках стандартных растворов,

9) Добавляли в каждую лунку по 100мкл стоп-раствора. Цвет сразу же менялся на желтый,

10) Измеряли оптическую плотность на спектрофотометрическом ридере «Biotek» при длине волны 450нм спустя 20-30мин после добавления стоп-раствора.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Методика определения КИМ-1 методом ELISA

Материал для анализа – моча

Общая схема проведения анализа:

- подготовить все реагенты, образцы и стандарты в соответствии с инструкциями (см. ниже),
- инкубировать стандарты и образцы в иммобилизованном титрационном микропланшете КИМ-1,
- удалить и аккуратно промыть лунки со стандартами и образцами и добавить биотинилированные антитела к КИМ-1,
- аккуратно смыть излишки антител, затем добавить стрептавидин (HRP) и инкубировать,
- аккуратно промыть избыток конъюгата и добавить субстрат ТМБ. Раствор должен окраситься в синий цвет,
- добавить стоп-раствор, чтобы получить желтый цвет,
- измерить оптическую плотность на планшетном спектрофотометре при 450 нм.

Подготовка реагентов (Все компоненты должны быть комнатной температуры. Для этого необходимо вынуть из холодильника реагенты за 4 часа до проведения анализа. Подготовить ровно столько реагента, сколько необходимо в день проведения эксперимента):

1) Промывочный буфер. Приготовить промывочный буфер путем разбавления 50мл прилагаемого концентрата (20X) промывочного буфера концентрата с 950 мл деионизированной воды. Хранить разбавленный промывочный буфер при комнатной температуре. Разбавленный промывочный буфер может быть использован в течение 3 месяцев,

2) Стандарт КИМ-1 (Всегда готовить свежий набор стандартов для каждого использования. Утилизировать рабочие стандартные разведения после использования, так как они не хранятся).

Порядок приготовления разведений стандартов КИМ-1:

- нагреть стандартный раствор КИМ-1 до комнатной температуры;

- пронумеровать 7 пробирок: стандарты 1-7;
- внести пипеткой 490 мкл буфера для анализа в пробирку 1;
- пипеткой внести 250 мкл буфера для анализа в пробирки 2–7;
- добавить 10 мкл стандартного раствора КИМ-1 с концентрацией 2,5нг/мл в пробирку № 1 и оставить на 5 минут для растворения;
- отобрать 250 мкл из пробирки 1 в пробирку 2 и хорошо перемешать;
- добавьте 250 мкл пробирки 2 в пробирку 3 и хорошо перемешать;
- повторить это для пробирок 4-7;

Разведения стандарта указаны в таблице 1.

Таблица 1 – Разведения стандарта

| № пробирки | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------------------------|-----|-----|-----|------|-------|--------|-----|
| Концентрация КИМ-1, пкг/мл | 500 | 250 | 125 | 62,5 | 31,25 | 15,625 | 7,8 |

3) Обработка образцов. Образцы мочи должны быть разбавлены не менее 1:4 с помощью буфера для анализа для устранения эффектов интерференции. Минимальное рекомендуемое разведение может быть оптимальным не для всех видов мочи. Образцы для уровней эндогенного КИМ-1 могут варьироваться между группами. Поэтому параметры разведения для каждого анализа могут быть уникальными.

Линейность

Минимальное необходимое разведение мочи составляет 1:4. Это было определено путем серийного разведения буфером для анализа образцов мочи у пациентов с заболеваниями почек и идентификацию разведения, при котором наблюдалась линейность.

Все остальные реагенты в этом наборе готовы к использованию в том виде, в котором они поставляются.

Процедура анализа (Все материалы и подготовленные реагенты должны иметь комнатную температуру перед использованием. Рекомендуется анализировать все контроли и образцы в дублях. Удалить ненужные для анализа лунки и вернуть их в пакет с осушителем и запечатать. Хранить неиспользуемые лунки в 4°C.):

- внести пипеткой 100 мкл буфера для анализа в лунку с отрицательным контролем (концентрация стандарта КИМ-1 0пг/мл) и скважины НСБ. Оставьте пустые лунки пустыми,

- внести 100 мкл стандартов с №1 по №7 в соответствующие лунки,

- внести 100 мкл образцов в соответствующие лунки,

- запечатать планшет с помощью специальной пленки и инкубировать в течение 30 минут при перемешивании на шейкер при комнатной температуре (Оптимальная скорость для каждого шейкера будет разной и может варьироваться от 120-700 об/мин. Скорость должна быть установлена таким образом, чтобы перемешивание лунок было не настолько интенсивно, чтобы содержимое лунок выплескивалось),

- удалить содержимое лунок и промыть, добавив ~300 мкл 1X промывочного буфера в каждую лунку. Удалить промывочный буфер и повторить промывку еще 3 раза (всего 4 промывки). После последней промывки и удаления промывочного буфера, перевернуть планшет и постучать им безворсовой бумажной салфетке, чтобы удалить остатки промывочного буфера,

- внести пипеткой по 100 мкл антитела в каждую лунку, кроме «бланков» и NSB-лунок. Добавить 100 мкл буфера для анализа в лунки NSB и оставить «бланки» пустыми,

- запечатать планшет и инкубировать в течение 30 минут при перемешивании на шейкере при комнатной температуре,

- удалить содержимое лунок и промыть, добавив ~300 мкл 1X промывочного буфера в каждую лунку. Удалить промывочный буфер из лунок и повторить промывку еще 3 раза (всего 4 промывки). После последней промывки и удаления промывочного буфера, перевернуть планшет и постучать им безворсовой бумажной салфетке, чтобы удалить остатки промывочного буфера,

- добавить по 100мкл КИМ-1 конъюгата в каждую лунку, кроме контрольной,

- запечатать планшет и инкубировать в течение 30 минут при перемешивании на шейкере при комнатной температуре,

- удалить содержимое лунок и промыть, добавив ~300 мкл 1X-промывочного буфера в каждую лунку. Удалить промывочный буфер из лунок и повторить промывку еще 3 раза (всего 4 промывки). После последней промывки и удаления промывочного буфера, перевернуть планшет и постучать им безворсовой бумажной салфетке, чтобы удалить остатки промывочного буфера,

- внести пипеткой по 100 мкл раствора ТМБ в каждую лунку,

- запечатать планшет и инкубировать 20 минут при встряхивании на шейкере при комнатной температуре,

- внести пипеткой по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку,

- измерить оптическую плотность на планшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм. Если планшетный ридер не имеет функции измерения с поправкой на «бланк», вручную вычистить среднее значение оптической плотности «бланка» из всех показаний.

Расчеты

Доступны несколько вариантов расчета концентрации КИМ-1 в образцах. Рекомендуется, чтобы данные обрабатывались с помощью программного обеспечения для иммуноанализа, использующего 4-параметрическую логистику (4PL) подбора кривых.

Концентрацию КИМ-1 можно рассчитать следующим образом:

- рассчитать среднюю чистую оптическую плотность (OD) для каждого стандарта и образца с помощью вычитания средней OD NSB-лунки из средней OD для каждого стандарта и образца (Средняя чистая OD = средняя OD - средняя NSB OD),

- используя программное обеспечение для анализа данных, построить график средней чистой OD для каждого стандарта по сравнению с концентрацией КИМ-1 в каждом стандарте.