

Proteomska analiza potencijalnih biljega akutne ozljede bubrega u urinu pacijenata na terapiji vankomicinom

Proteomics analysis of potential biomarkers of acute kidney injury in urine from patients receiving vancomycin

Ivona Štanfel¹, Marko Klobučar¹, Sandra Kraljević Pavelić¹, Ana Vujaklija Brajković², Mirela Sedić^{1*}

Sažetak. Cilj: Vankomicin je antibiotik koji se koristi za liječenje infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim bakterijama, no kod nekih pacijenata uzrokuje ozljedu bubrega. Budući da standardni biomarkeri ozljede bubrega ne pokazuju dovoljnu osjetljivost i specifičnost, potrebno je pronaći nove biomarkere kako bismo mogli ranije detektirati poremećaje bubrežne funkcije te pravovremenim prekidom ili promjenom terapije spriječiti daljnje ozljede bubrega. Cilj je rada bio usporediti proteomske profile urina dviju pacijentica oboljelih od upale pluća koje su primale terapiju vankomicinom sa i bez kliničkih znakova ozljede bubrega uzrokovanih navedenim antibiotikom, kako bismo identificirali nove potencijalne proteinske biomarkere akutne ozljede bubrega uzrokovanog vankomicinom.

Prikaz slučaja: Uzorci urina prikupljeni su treći i sedmi dan terapije vankomicinom od pacijentice sa i pacijentice bez kliničkih znakova bubrežne disfunkcije te su analizirani dvodimenzionalnom gel elektroforezom kombiniranom s MALDI-TOF/TOF masenom spektrometrijom. Vidljive razlike u proteomskim profilima urina između dviju pacijentica javljaju se treći, a naročito su izražene sedmi dan terapije. Dvodimenzionalna gel elektroforeza kombinirana s masenom spektrometrijom potvrdila je već ranije dokazanu ulogu proteina neutrofilnog lipokalina povezanog s gelatinazom (NGAL, engl. *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) kao biomarkera akutne ozljede bubrega, te otkrila ekspresiju citoskeletnog keratina 1 tipa II i retinol-vezujućeg proteina 4 (RBP4, engl. *retinol-binding protein 4*) samo u urinu pacijentice kod koje je terapija vankomicinom uzrokovala poremećaj bubrežne funkcije. **Zaključci:** Citoskeletni keratin 1 tipa II i retinol-vezujući protein 4 mogli bi predstavljati nove potencijalne biomarkere ozljede bubrega uzrokovane vankomicinom. Potrebne su daljnje studije na većem broju pacijenata kako bi se validirali dobiveni rezultati i utvrdio njihov potencijalni dijagnostički i klinički značaj.

Cljučne riječi: akutna ozljeda bubrega; biomarkeri; dvodimenzionalna gel elektroforeza; masena spektrometrija; urin; vankomicin

Abstract. Aim: Vancomycin is an antibiotic used to treat infections caused by Gram-positive bacteria which can induce renal injury in some patients. Since standard biomarkers of kidney injury lack sufficient sensitivity and specificity, there is an unmet need for novel biomarkers that would enable early detection of renal injury and timely cessation or modification of treatment to prevent more severe kidney injury. The goal of this paper was to compare proteomics profiles of urine samples collected from two vancomycin-treated patients suffering from pneumonia with and without clinical symptoms of drug-induced renal dysfunction as to identify novel potential protein biomarkers of vancomycin-induced kidney injury. **Case report:** Urine samples were collected on the third and seventh day of vancomycin therapy from patients with and without clinical signs of acute kidney injury. Samples were analysed by two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. Differences in urinary proteomes between these two patients could be observed on the third and especially on the seventh day of therapy. Two-dimensional gel electrophoresis combined with mass spectrometry confirmed previously established role of neutrophil gelatinase-associated lipoc-

¹Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Rijeka

²Zavod za intenzivnu medicinu, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb, Zagreb

***Dopisni autor:**

Doc. dr. sc. Mirela Sedić
Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci
Radmile Matejčić 2, 51 000 Rijeka
e-mail: msedic@biotech.uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

alin (NGAL) as biomarker of renal injury, and revealed the expression of keratin 1 type II cytoskeletal and retinol-binding protein 4 (RBP4) only in urine from the patient with vancomycin-induced renal dysfunction. **Conclusions:** Keratin 1 type II cytoskeletal and retinol-binding protein 4 could be considered novel potential biomarkers of vancomycin-induced kidney injury. Additional studies with larger patient cohorts are needed to validate these findings and investigate their potential diagnostic and clinical significance.

Key words: acute kidney injury; biomarkers; mass spectrometry; two-dimensional gel electrophoresis; urine; vancomycin

Biomarkeri akutne ozljede bubrega koji se danas standardno koriste u klinici ne pokazuju dovoljnu osjetljivost i specifičnost, naročito u ranoj fazi ozljede bubrega, što potiče istraživanja usmjerena na identifikaciju novih biljega koji bi omogućili ranu detekciju bubrežne disfunkcije, kako bi bilo moguće pravovremenim prekidom ili promjenom terapije spriječiti daljnje ozljede bubrega.

UVOD

Bubrezi imaju nekoliko važnih funkcija, a jedna od najvažnijih je filtriranje plazme i izlučivanje otpadnih tvari proizvedenih metabolizmom te stranih tvari iz organizma. Budući da primaju veliku količinu krvi, odnosno 25 % srčanog minutnog volumena, te je njihova zadaća uklanjanje toksičnih tvari iz krvne plazme, bubrezi su u povećanoj mjeri izloženi tvarima s toksičnim učinkom među koje možemo ubrojiti i neke lijekove¹. Mehanizmi toksičnih učinaka lijekova različiti su, a najčešće dolazi do izravnog štetnog djelovanja na stanice kanalića. Također može doći do indukcije upale, opstrukcije kanalića, ali i neizravnih toksičnih učinaka zbog promjene protoka krvi u bubrežima². Toksičnim učincima posebno su izložene stanice u kanalićima nefrona budući da u njima zbog mehanizama aktivnog prijenosa tijekom procesa reapsorpcije i sekrecije dolazi do povećane koncentracije toksičnih tvari, među koje možemo ubrojiti i lijekove poput vankomicina.

Vankomicin je antibiotik koji se već šezdesetak godina koristi za liječenje infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim bakterijama, unatoč tome što je akutna ozljeda bubrega jedna od ozbiljnijih nuspojava ovog lijeka. Otkriven je 1957. godine, kada

je izoliran iz gljivice *Streptomyces orientalis* u šumama Bornea, a odobren je već 1958. godine po ubrzanom postupku, nakon što je uočeno kako djeluje protiv bakterija otpornih na dotadašnje antibiotike³. Prema svojoj strukturi vankomicin je triciklički glikopeptid koji se veže za monomere peptidoglikana mureina u staničnoj stijenci bakterija te dovodi do konformacijske promjene koja onemogućuje daljnju ugradnju mureinskih monomera u nosivost lanac peptidoglikana^{3,4}. Na taj način vezanje vankomicina prekida sintezu stanične stijenke, što naposljetku dovodi do umiranja bakterijskih stanica zbog osmotskog šoka⁴. Gram-pozitivne bakterije imaju deblji sloj peptidoglikana pa je vankomicin protiv tih bakterija posebno učinkovit te se koristi za liječenje infekcija poput bakteremije, osteomijelitisa i upale pluća, koje su uzrokovane tim bakterijama³. Zbog ozbiljnih nuspojava poput akutne ozljede bubrega, danas se vankomicin uglavnom koristi za liječenje infekcija uzrokovanih bakterijama koje su otporne na ostale antibiotike kao što su, primjerice, meticilin rezistentni *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) te meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA)^{3,5}.

Akutna ozljeda bubrega predstavljala je velik problem prilikom korištenja vankomicina još od njegova otkrića, no u početku je pripisivana nečistoćama koje su se pojavljivale zbog tadašnjeg procesa proizvodnje^{3,5}. Kasnije je proces proizvodnje vankomicina poboljšana, te gotovi lijek ne sadrži nečistoće, no prema provedenim istraživanjima akutna ozljeda bubrega i dalje se pojavljuje kod 10 – 20 % pacijenata koji primaju konvencionalnu dozu, te kod 30 – 40 % pacijenata koji primaju višu dozu vankomicina^{5,6}. Poznato je kako se 80 – 90 % vankomicina u nepromijenjenom obliku izlučuje bubrežima te kako se ozljeda bubrega uočava između 5. i 7. dana terapije, no mehanizam kojim vankomicin dovodi do ozljede bubrega još uvijek nije poznat^{3,5,6}. Predloženo je da bi proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta te oksidativni stres u stanicama proksimalnog kanalića koji dovodi do ishemije i nekroze stanica mogli biti odgovorni za akutnu ozljedu bubrega uzrokovanu vankomicinom^{5,7}. Pretpostavlja se kako do nekroze dolazi zbog nakupljanja vankomicina u stanicama proksimalnog kanalića te kako vankomicin

može izmijeniti funkciju mitohondrija i reapsorpcijsku funkciju stanica ovisnu o energiji⁵⁻⁷. Kao jedan od mogućih mehanizama nastanka akutne ozljede bubrega uzrokovane vankomicinom predložen je i akutni intersticijski nefritis kod kojeg dolazi do imunološke reakcije, odnosno nastajanja edema te nakupljanja mononuklearnih stanica poput T-limfocita i makrofaga u intersticiju bubrega⁶. Na temelju istraživanja provedenih na miševima, kao jedan od mogućih mehanizama predložena je i aktivacija komplementa^{6,7}.

Budući da lijekovi poput vankomicina mogu imati nefrotoksične učinke čije se posljedice klinički manifestiraju tek u kasnoj fazi ozljede bubrega, važno je pronaći biomarkere koji omogućuju ranu detekciju poremećaja bubrežne funkcije kako bi se pravovremenim ukidanjem terapije spriječila daljnja ozljeda bubrega. Biomarkeri koji se tradicionalno koriste za utvrđivanje akutne ozljede bubrega su serumski kreatinin te urea u krvi⁸. Iako ti biomarkeri još uvijek predstavljaju *zlatni standard* za detekciju akutne ozljede bubrega, utvrđeno je da imaju nisku osjetljivost i specifičnost. Primjerice, kreatinin je produkt metabolizma mišića, te njegova razina ovisi o dobi, spolu, mišićnoj masi i težini, a osim kod ozljede bubrega razina kreatinina se mijenja i kod šoka, dehidracije, eklampsije i rhabdomiolize⁸. Urea nastaje razgradnjom proteina, a osim kod ozljede bubrega razina uree se mijenja i kod srčanog udara, gastrointestinalnog krvarenja, hipovolemije, dehidracije i šoka⁸. Jedan od novijih biomarkera akutne ozljede bubrega koji zasad najviše obećava je neutrofilni lipokalin povezan s gelatinazom (NGAL; engl. *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*)^{9,10}. Prvotno je otkriven kod aktiviranih neutrofila, a osim neutrofila, NGAL luče i stanice bubrežnih kanalića prilikom ozljede. U normalnim uvjetima urinom se izlučuje koncentracija NGAL-a manja od 5 ng/mL⁹. Prilikom ozljede proksimalnog kanalića sinteza NGAL-a se povećava, a reapsorpcija smanjuje, što dovodi do povećanja njegove koncentracije u urinu. Velika prednost NGAL-a kao biomarkera je to što se njegova razina u urinu poveća unutar 2 sata nakon nastanka ozljede, što znači da predstavlja rani biljeg akutne ozljede bubrega¹⁰. Druga je velika prednost to što nakon sinteze i izlučivanja ne dolazi do njegove

razgradnje^{9,10}. NGAL kao biomarker akutne ozljede bubrega ima i neke nedostatke, a najveći je taj što ga luči više različitih vrsta stanica, uključujući neutrofile, stanice pluća i gastrointestinalnog trakta, pa povećanje sinteze i izlučivanja NGAL-a u odgovoru na bolesti tih organa ili sepsu mogu dovesti do njegovog povećanog izlučivanja u urinu i bez ozljede bubrega¹⁰.

S obzirom na nedostatke navedenih biomarkera ozljede bubrega, istraživanja usmjerena identifikaciji novih biljega toksičnih učinaka lijekova na bubrežnu funkciju imaju važnu ulogu u razvoju dijagnostičkih alata u nefrologiji. Pronalaženje novih potencijalnih biomarkera akutne ozljede bubrega u urinu znatno je olakšano zahvaljujući modernim visokoprotocnim metodama proteomike koje omogućuju globalno profiliranje proteina urina i identifikaciju onih proteina čija se razina ekspresije mijenja u pacijenata na terapiji koji se očituju kliničkim simptomima akutne ozljede bubrega u odnosu na pacijente na istoj terapiji kod kojih nije došlo do poremećaja bubrežne funkcije. Proteinski biomarkeri akutne ozljede bubrega bolji su od genomskih ili transkriptomskih jer izravno odražavaju trenutno stanje u bubrežima.

Urin je posebno dobar biološki materijal za identifikaciju novih proteinskih biomarkera akutne ozljede bubrega, budući da može biti prikupljen na neinvazivan način u velikim količinama, sadrži proteine i peptide koji su relativno stabilni i manje složeni u odnosu na druge kliničke uzorke poput seruma ili plazme, a količina i sastav proteoma urina odražavaju promjene u funkciji bubrega i urogenitalnog trakta^{11,12}. Brojne studije pokazale su da metode proteomike koje se temelje na masenoj spektrometriji imaju velik potencijal u identifikaciji novih proteinskih biljega bubrežne disfunkcije, stoga predstavljaju važnu komponentu u toksikološkim ispitivanjima¹³⁻¹⁵. Istraživanje proteoma urina otežavaju brojni izazovi koji se pojavljuju tijekom analize urina poput varijabilnosti u sastavu i koncentraciji proteina u urinu različitih osoba do kojih dolazi zbog razlika u unosu tekućine i hrane te zbog tjelovježbe, načina života i cirkadijalnog ritma, a istraživanje je dodatno otežano i zbog činjenice da se proteom urina ne razlikuje samo među pojedincima već i

kod iste osobe u različito vrijeme^{11,16}. Standard u vezi vremena uzorkovanja urina još uvijek ne postoji, no preporučuje se uzimanje urina nakon odmaranja te uvijek u isto doba dana, kako bi se smanjila varijabilnost proteoma^{17,18}.

Osnovni cilj pokusne studije prikazane u ovom radu bio je identifikacija novih potencijalnih proteinskih biomarkera akutne ozljede bubrega u urinu pacijentica na terapiji vankomicinom. U tu svrhu provedena je dvodimenzionalna gel elektroforeza uzoraka urina koji su prikupljeni trećeg i

Dvodimenzionalna gel elektroforeza u kombinaciji s MALDI-TOF/TOF masenom spektrometrijom pokazala se kao adekvatna metoda za analizu urinarnih biomarkera čiji rezultati sugeriraju da bi retinol vezujući protein 4 i citoskeletni keratin 1 tipa II mogli biti novi potencijalni biljezi akutne ozljede bubrega uzrokovane vankomicinom.

sedmog dana terapije vankomicinom od pacijentice kod koje je tijekom terapije došlo do pojave kliničkih znakova akutne ozljede bubrega te pacijentice kod koje nije došlo do poremećaja bubrežne funkcije. Usporedbom proteomskih profila urina pacijentice sa i bez kliničkih znakova štetnog učinka vankomicina na bubrežnu funkciju detektirali smo specifične razlike u ekspresiji proteina, čiji smo identitet potom utvrdili pomoću MALDI-TOF/TOF (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionisation – time of flight/time of flight*) masenog spektrometra.

PRIKAZ SLUČAJA

Uzorci prvog jutarnjeg urina pacijenata na terapiji vankomicinom prikupljeni su u okviru suradnje s Kliničkim bolničkim centrom Zagreb uz odobrenje

Etičkog povjerenstva Kliničkoga bolničkog centra Zagreb i informiranog pristanka svakog pacijenta koji je sudjelovao u istraživanju. Pacijenti su odabrani na temelju kliničko-dijagnostičkih parametara među kojima su najvažniji osnovna dijagnoza te razina NGAL-a izmjerena 1., 3. i 7. dana terapije vankomicinom (tablica 1). Dodatni kriteriji pri odabiru bili su da pacijenti nemaju dijabetes ili proteinuriju, te da su tijekom terapije vankomicinom primali što manji broj ostalih lijekova koji bi potencijalno mogli biti nefrotoksični. Na temelju analize parametara odabrane su dvije pacijentice s dijagnosticiranom upalom pluća kod kojih osim respiratorne insuficijencije nije došlo do zatajenja drugih organa. Kod jedne pacijentice je tijekom terapije vankomicinom došlo do očitovanja kliničkih znakova akutne ozljede bubrega, budući da su vrijednosti NGAL-a bile povišene kod sva tri mjerenja, dok kod druge pacijentice nije došlo do pojave kliničkih znakova akutne ozljede bubrega, već su razine NGAL-a kod sva tri mjerenja bile u granicama referentne vrijednosti (ispod 131,7 ng/mL) (tablica 1).

Kvantifikacija proteina u uzorcima urina prikupljenim od dviju odabranih pacijentica na 3. i 7. dan terapije vankomicinom provedena je korištenjem Qubit® fluorometra i pripadajućeg seta reagensa za kvantifikaciju Qubit® Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD) prema uputama proizvođača.

Ukupna količina od 600 µg proteina svakog uzorka otopljena je u 330 µL pufera za rehidraciju (7M urea, 2M tiourea, 4 % (w/v) CHAPS, miliQ voda i 1 % (w/v) DTT). Aktivna rehidracija IPG (engl. *immobilized pH gradient*) trakica (18 cm, 3-10 NL, Bio-Rad Laboratories, Hercules, SAD) provedena je pri naponu od 50 V u trajanju od 14 h pri 20 °C. Nakon završene rehidracije, prove-

Tablica 1. Kliničko-dijagnostički parametri za ispitanike uključene u studiju

Dob	Spol	Osnovna dijagnoza	Dijabetes	Proteinurija	NGAL 1. dan ng/mL	NGAL 3. dan ng/mL	NGAL 7. dan ng/mL	Zatajenje Drugih organa	Druga nefrotoks. Terapija	Ishod
53	Ž	upala pluća	ne	ne	443,9	523,8	2787,6	respiratorna insuficijencija	ciprofloksacin, penicilin	smrt
75	Ž	upala pluća	ne	nepoznato	21,5	18,0	9,0	respiratorna insuficijencija	karbapenemi, kaspofungin, anidulafungin	premjestaž na drugi odjel

*svjetlijom bojom označene su normalne, a tamnijom povišene vrijednosti NGAL-a

deno je izoelektrično fokusiranje IPG trakica u koracima do maksimalne vrijednosti od 90 000 Vh. IPG trakice zatim su ekvilibrirane u 2 pufera za ekvibraciju istoga početnog sastava (50 mM Tris-HCl pH 8,8 (Sigma-Aldrich, SAD), 6M urea (Sigma-Aldrich, SAD), 30 % w/v glicerol (Sigma-Aldrich, SAD), 2 % w/v SDS (Sigma-Aldrich, SAD), bromfenol modriilo), u koje je u svrhu redukcije disulfidnih mostova među cisteinskim ostacima dodan ditiotritol (1 % w/v DTT, Sigma-Aldrich, SAD), a u svrhu njihove alkilacije je dodan jodoacetamid (25 g dm⁻³ IAA, Sigma-Aldrich, SAD). Nakon završene ekvibracije IPG trakica izvršena je poliakrilamidna gel elektroforetska separacija proteina (12 % SDS PAGE (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*); 20 × 20 cm) pri konstantnom naponu od 25mA po gelu i u trajanju od približno 5 h. Nakon dovršetka elektroforeze gelovi su obojani s koloidnom otopinom Coomassie Brilliant Blue G (Bio-Rad Laboratories, Hercules, SAD) i slikani pomoću uređaja ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, SAD).

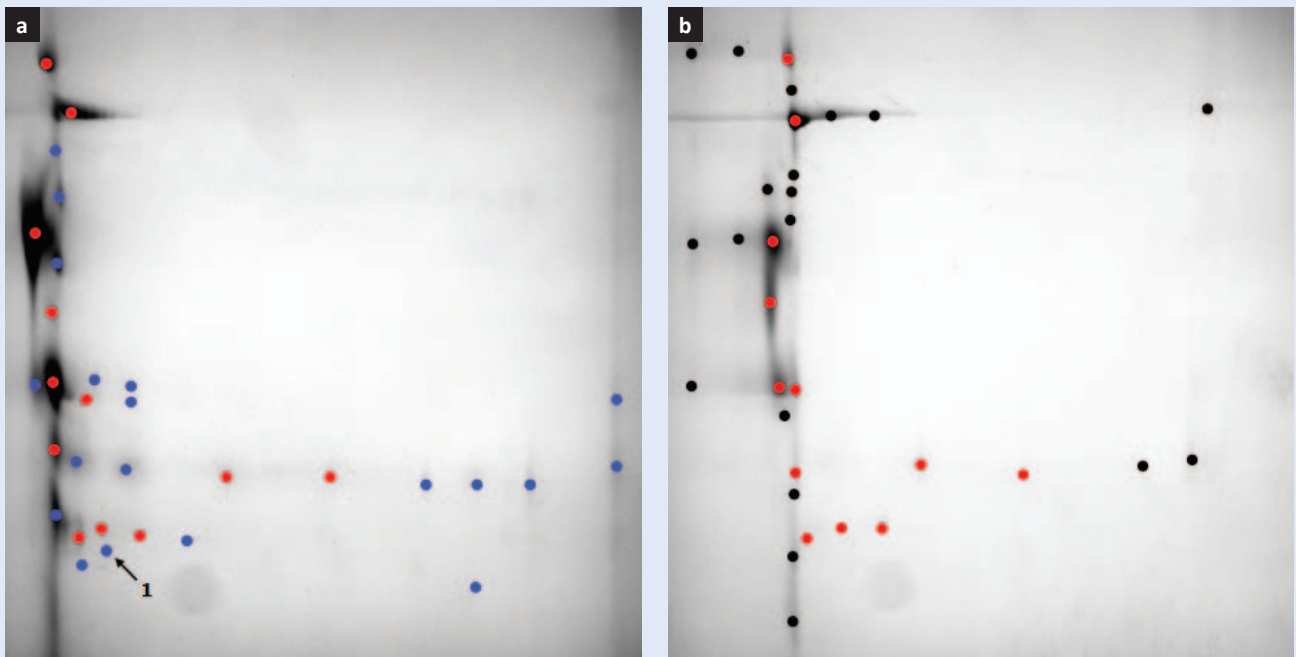
Gelovi dobiveni dvodimenzionalnom gel elektroforezom analizirani su pomoću programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). Kako bi se izbjegle varijacije do kojih je moglo doći prilikom nanošenja proteina, te bojenja i odbojavanja gelova, kvantifikacija proteinskih točaka provedena je uz normalizaciju temeljenu na računanju relativnog volumena za svaku od točaka¹⁹.

Gelovi dobiveni dvodimenzionalnom gel elektroforezom urina prikupljenog na treći dan terapije vankomicinom prikazani su na slici 1. Usporedbom gelova vidljivo je kako je kod pacijentice kod koje je tijekom terapije došlo do pojave kliničkih znakova bubrežne disfunkcije prisutan podjednak broj proteinskih točaka u odnosu na pacijenticu kod koje nije došlo do ozljede bubrega (31 točka). Nadalje, analizom slika gelova pomoću računalnog programa ImageMaster 2D pronađeno je ukupno 12 zajedničkih proteinskih točaka koje se pojavljuju kod obje pacijentice, pri čemu je značajnija promjena ekspresije opažena kod dvije proteinske točke. Također je pronađeno ukupno 38 jedinstvenih točaka, od kojih se 19 pojavljuju kod pacijentice s akutnom ozljedom bubrega, te 19 kod pacijentice kod koje nije došlo do akutne ozljede bubrega.

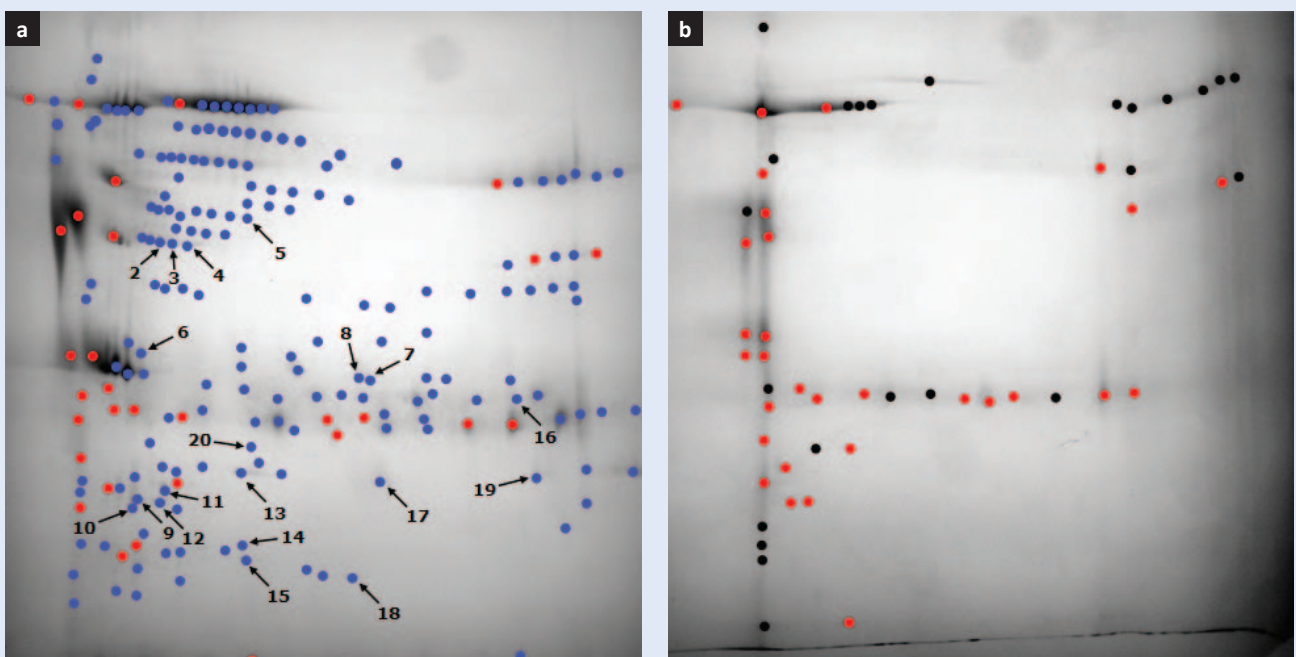
Gelovi dobiveni dvodimenzionalnom gel elektroforezom proteina iz uzoraka urina prikupljenih od pacijentica na sedmi dan terapije vankomicinom prikazani su na slici 2. Na sedmi dan terapije kod pacijentice kod koje su se razvili klinički znakovi akutne ozljede bubrega prisutno je daleko više proteinskih točaka (206 točaka) u odnosu na pacijenticu bez klinički vidljive ozljede bubrega (55 točaka). Rezultati analize pokazali su kako je na sedmi dan terapije moguće detektirati 30 zajedničkih proteinskih točaka prisutnih kod obje pacijentice, s tim da je značajnija promjena ekspresije opažena kod čak 22 točke. Nadalje, pronađena je sveukupno 201 jedinstvena proteinska točka; 176 se među njima pojavljuje kod pacijentice kod koje je tijekom terapije došlo do akutne ozljede bubrega, a 25 kod pacijentice kod koje se nisu razvili klinički znakovi akutne ozljede bubrega.

Za daljnju identifikaciju na masenom spektrometru odabrano je 20 proteinskih točaka koje su bile specifično ekspimirane samo u urinu pacijentice s ozljedom bubrega nakon trećeg i sedmog dana terapije (kvalitativna analiza) (slike 1 i 2). Odabrane proteinske točke izrezane su iz gelova te je izvršena digestija pomoću tripsina prema prethodno opisanom protokolu²⁰. Neposredno prije analize putem spektrometrije masa provedeno je odsoljavanje dobivenih peptida uz korištenje ZipTipC18 tipseva prema uputama proizvođača (Millipore Corporation, Billerica, SAD).

Nakon odsoljavanja, u zasebnu epruveticu dodano je 1 µL otopine odsoljenih peptida i 1 µL otopine α-cijano-4-hidroksi-cimetne kiseline (CHCA (engl. *α-cyano-4-hydroxycinnamic acid*) matrice), a zatim je 0,5 µL pripremljene otopine nanoseno na MALDI pločicu (MTP 384 ground steel BC, Bruker, Billerica, SAD). Nakon nanošenja uzoraka MALDI pločica je stavljena u uključeni digestor tijekom ~5 minuta da se smjesa matrice i peptida kristalizira, a zatim je pričvršćena na držač i umetnuta u MALDI-TOF/TOF maseni spektrometar (ultrafleXtreme, Bruker, Billerica, SAD). Spektri masa snimani su uz intenzitet lasera između 60 – 70 % te odabrani raspon detektiranih molekulskih masa peptidnih fragmenata između 700 – 4000 kDa. Za svaki od proteina snimljeno je stotinjak spektara, a sumirani spektar je analiziran pomoću programa Mascot (Matrix Science, London, UK). Analiza spektara u programu Mascot provedena



Slika 1. Slike gelova dobivenih dvodimenzionalnom gel elektroforezom uzoraka urina prikupljenih na treći dan terapije vankomicinom: a) pacijentica s kliničkim znakovima akutne ozljede bubrega, b) pacijentica s normalnom bubrežnom funkcijom. Crvenim kružićem označene su proteinske točke zajedničke za oba gela, crnim kružićem su obilježene točke detektirane samo kod pacijentice s normalnom bubrežnom funkcijom, dok su plavim kružićem označene proteinske točke koje se specifično javljaju samo u urinu pacijentice s kliničkim znakovima akutne ozljede bubrega. Strjeljice označavaju proteinske točke koje su bile izrezane iz gela i čiji je identitet bio utvrđivan pomoću masene spektrometrije.



Slika 2. Slike gelova dobivenih dvodimenzionalnom gel elektroforezom uzoraka urina prikupljenih na sedmi dan terapije vankomicinom: a) pacijentica s kliničkim znakovima akutne ozljede bubrega, b) pacijentica s normalnom bubrežnom funkcijom. Crvenim kružićem označene su proteinske točke zajedničke za oba gela, crnim kružićem su obilježene točke detektirane samo kod pacijentice s normalnom bubrežnom funkcijom, dok su plavim kružićem označene proteinske točke koje se specifično javljaju samo u urinu pacijentice s kliničkim znakovima akutne ozljede bubrega. Strjeljice označavaju proteinske točke koje su bile izrezane iz gela i čiji je identitet bio utvrđivan pomoću masene spektrometrije.

je nakon kalibracije, uz odabrane parametre: Baza podataka: SwissProt; enzim: tripsin, uz dvije dozvoljene pogreške prilikom cijepanja; taksonomija: Homo sapiens; fiksirane modifikacije: kar-

bamidometilacija (C); varijabilne modifikacije: oksidacija (M); tolerancija mase : 50 ppm. Analizom na masenom spektrometru identificirano je 10 proteina (tablice 2 i 3), među kojima su

Tablica 2. Proteini identificirani samo u urinu pacijentice koja je razvila kliničke znakove akutne ozljede bubrega nakon trećeg dana terapije vankomicinom

Oznaka točke na gelu	UniProt/Swiss Prot ID	Naziv proteina	Mascot score	Pokrivenost sekvence	Izračunata molekulska masa (Da)	Izrač. Pi	Biolška uloga
1	Q96HA8	N-terminalna glutamin amidohidrolaza	29	14 %	24 120	5.46	posreduje deamidaciju glutamina na N-terminalnim krajevima proteina i time omogućuje njihovu bikvitinaciju i razgradnju

Tablica 3. Proteini identificirani samo u urinu pacijentice koja je razvila kliničke znakove akutne ozljede bubrega nakon sedmog dana terapije vankomicinom

Oznaka točke na gelu	UniProt/Swiss Prot ID	Naziv proteina	Mascot score	Pokrivenost sekvence	Izračunata molekulska masa (Da)	Izrač. Pi	Biolška uloga
5	Q9NX63	MIC19 podjedinica MICOS kompleksa	33	22 %	26 421	8.48	održavanje stabilnosti MICOS kompleksa i morfologije mitohondrijskih krista, kao transkripcijski faktor potiče apoptozu
8	P04264	keratin tipa II citoskeletni 1	58	19 %	66 170	8.15	stvara keratinske lance tijekom diferencijacije epitelnih tkiva, može regulirati aktivnost PKC i SRC kinaza
9	P02753	retinol vezujući protein 4(RBP4)	83	50 %	23 337	5.76	dostavlja retinol iz jetre u periferna tkiva, u kompleksu s retinolom veže se za transtiretin i sprječava njegovu filtraciju u glomerulu
12	O60701	UDP-glukoza 6-dehidrogenaza	41	11 %	55 674	6.73	sudjeluje u biosintezi glikozaminoglikana koji čine izvanstanični matriks i sudjeluje u prijenosu signala te rastu stanica
13	P04264	keratin tipa II citoskeletni 1	58	19 %	66 170	8.15	stvara keratinske lance tijekom diferencijacije epitelnih tkiva, može regulirati aktivnost PKC i SRC kinaza
16	P81133	usmjereni homolog 1 (SIM1)	33	5 %	86 373	7.03	transkripcijski faktor koji sudjeluje u diferencijaciji stanica, razvoju živčanog sustava i mokraćovodnog pupoljka
18	P13645	keratin tipa I citoskeletni 10	42	8 %	59 020	5.13	sudjeluje u diferencijaciji eratinocita te je jedan od sastavnih dijelova citoskeleta epitelnih stanica
19	P80188	neutrofilni lipokalin povezan s gelatinazom (NGAL)	113	46 %	22 745	9.02	protein koji veže željezo, uključen u proces prirodne imunosti, razvoja bubrega te proces apoptoze
20	Q13360	protein s cinkovim prstom 177	37	9 %	56 343	8.53	može biti uključen u regulaciju transkripcije

tri proteina imala najveći Mascot score (vjerojatnost da je poklapanje između eksperimentalnih podataka i sekvence u bazi podataka nasumični događaj) uključujući citoskeletni keratin 1 tipa II, neutrofilni lipokalin povezan s gelatinazom (NGAL; engl. *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) i retinol-vezujući protein 4 (RBP4; engl. *retinol-binding protein 4*), što ukazuje na ulogu navedenih proteina u mehanizmima renalne toksičnosti vankomicina.

RASPRAVA

Cilj pokusne studije opisane po prvi put u ovome radu bio je usporediti proteomske profile urina pacijentica s narušenom i normalnom bubrežnom funkcijom koje su bile na terapiji vankomicinom, kako bismo identificirali nove potencijalne biomarkere akutne ozljede bubrega uzrokovane navedenim antibiotikom.

Jedan od proteina koji je u ovom istraživanju identificiran s najvećom pokrivenosti sekvence je neutrofilni lipokalin povezan s gelatinazom (NGAL). NGAL je glikoprotein veličine 25 kDa koji pripada superobitelji lipokalina, proteina koji prenose male hidrofobne molekule kao što su lipidi, steroidni hormoni i retinoidi^{9,21}. Poput ostalih lipokalina, sastavljen je od β ploče građene od osam β lanaca koja je smotana u oblik bačve¹⁰. Budući da je unutrašnjost β bačve kod NGAL-a nešto plića i šira nego kod ostalih lipokalina te ima mali dio s pozitivnim nabojem, najčešće veže siderofore, male molekule koje vežu željezo²²⁻²⁴. Kako NGAL može vezati različite vrste siderofora, do danas je otkriveno da u organizmu može imati više različitih bioloških uloga.

Budući da najvećim afinitetom veže siderofore bakterija, NGAL ima važnu ulogu u prirodnom imunološkom sustavu: otpušta se iz neutrofilana mjestu infekcije, veže bakterijske siderofore te na taj način djeluje bakteriostatski²¹. Vezanjem eukariotskih siderofora NGAL je također uključen i u različite procese poput apoptoze stanica te razvoja bubrega^{22,23}. Budući da je za rast i razvoj stanica neophodno potrebna dostava željeza, tijekom razvoja bubrega NGAL potiče nastajanje glomerula, proksimalnih kanalića, Heinleove petlje i distalnih kanalića iz mezenhimalnih progenitorskih stanica, dok tijekom pojave ozljede bubrega odrasle oso-

be doprinosi očuvanju funkcije bubrega, koči apoptozu i potiče proliferaciju stanica^{24,25}.

NGAL se pojačano luči tijekom ozljede bubrega, pa se kao biomarker akutne ozljede bubrega spominje još od 2003. godine kada su provedena prva pretklinička istraživanja u kojima je pomoću mikročipova otkriveno kako kod modela akutne ozljede bubrega dolazi do pojačanog prepisivanja gena za NGAL²⁴. U jednom od prvih istraživanja u kojem je NGAL identificiran kao potencijalni biomarker akutne ozljede bubrega korišteni su mišji i štakorski model akutne ozljede bubrega uzrokovane ishemijom, mišji model akutne ozljede bubrega uzrokovane cisplatinom, te ljudske stanice proksimalnog kanalića kod kojih je deplecijom ATP izazvana ishemija²⁶. Analizom transkriptoma uz pomoć čipova utvrđeno je kako se ubrzo nakon izazvane ozljede bubrega razina ekspresije nekolicine gena, među kojima i gena za NGAL, povećala više od 10 puta, te je na temelju dobivenih rezultata NGAL-a predložen kao potencijalni biomarker ozljede bubrega. U brojnim istraživanjima koja su uslijedila analiziran je proteom kod životinjskih modela akutne ozljede bubrega, te je potvrđeno kako je razina NGAL-a povišena nakon ozljede bubrega izazvane ishemijom ili nefrotoksičnim učinkom lijekova²⁴. Jedno od tih istraživanja proveli su 2004. godine Mishra i suradnici koji su koristili mišji model akutne ozljede bubrega izazvane cisplatinom kako bi proučili ekspresiju NGAL-a u bubrezima i urinu²⁷. Provođenjem western blot analize i korištenjem imunofluorescencije utvrdili su kako se razina NGAL-a u bubrezima i urinu povećala unutar 3 sata od izazivanja ozljede bubrega, te su zaključili kako NGAL predstavlja rani biomarker nefrotoksičnosti cisplatine koji se može mjeriti u urinu.

Nakon što je na životinjskim modelima ustanovljeno kako se NGAL može koristiti kao potencijalni biomarker ozljede bubrega te kako je moguća njegova neinvazivna detekcija u urinu, započela su brojna istraživanja u kojima je bio cilj procijeniti prikladnost njegovog korištenja za otkrivanje ozljede bubrega u ljudi²⁴. U metaanalizi provedenoj 2009. godine Haase i suradnici analizirali su podatke prikupljene tijekom 19 takvih istraživanja provedenih u 8 zemalja diljem svijeta na više od 2 500 pacijenata te su zaključili kako se NGAL može koristiti za dijagnosticanje ozljede bubre-

ga i u ljudi²⁸. U novijoj metaanalizi provedenoj 2014. godine, Haase-Fielitz i suradnici analizirali su podatke iz 58 istraživanja provedenih na 16 500 pacijenata te su također potvrdili kako je NGAL dobar biomarker za dijagnosticiranje ozljede bubrega kod ljudi²⁹. NGAL je jedan od biomarkera ozljede bubrega koji zasad najviše obećavaju te je jedan od najčešće istraživanih biomarkera, a tijekom posljednjih godina razvijeno je i nekoliko različitih dijagnostičkih laboratorijskih uređaja za mjerenje njegove razine u urinu ili krvi pomoću kojih se rezultat dobiva unutar 10 do 35 minuta²⁹. Naša studija u kojoj smo također identificirali NGAL kao jedan od proteina koji se mogu specifično detektirati samo u urinu pacijentice na terapiji vankomicinom kod koje je došlo do ozljede bubrega izazvane navedenim antibiotikom, što je bilo evidentno iz kliničko-dijagnostičkih nalaza, dodatno potvrđuje da je dvodimenzionalna gel elektroforeza u kombinaciji s MALDI-TOF/TOF masenom spektrometrijom adekvatan metodološki pristup za identifikaciju urinarnih biomarkera renalne toksičnosti lijekova vezano za veliku osjetljivost i moć separacije.

Pored NGAL-a, u istraživanju smo kao potencijalni biomarker akutne ozljede bubrega uzrokovane vankomicinom također identificirali i retinol-vezujući protein 4 (RBP4). RBP4 je mali protein veličine 21 kDa koji također pripada superobitelji lipokalina^{21,23,30}. RBP4 se sintetizira u jetri, a njegova specifična biološka uloga je prijenos retinola, odnosno alkohola vitamina A, putem krvi iz jetre u periferna tkiva. Tijekom cirkulacije u krvi, RBP4 dolazi do bubrega gdje se zbog male molekulske mase lako filtrira u glomerulu, te se u proksimalnim kanalčićima ponovno reapsorbira u krv³¹. Gubitak RBP4 putem glomerularne filtracije dodatno je smanjen i time što se u krvnoj plazmi kompleks RBP4 i retinola veže za transtiretin te se na taj način onemogućava njegova filtracija u glomerulu^{21,23,30}. Iz tog razloga se u normalnim okolnostima u urinu izlučuje vrlo mala količina RBP4. Ako dođe do ozljede proksimalnih kanalčića, dolazi do smanjene reapsorpcije, što znači da se u takvim uvjetima RBP4 u većim količinama izlučuje u urinu³¹. Jedno od prvih istraživanja čiji rezultati podupiru tu činjenicu proveli su Peterson i Berggård 1971. godine. Svoje istraživanje proveli su s ciljem izolacije i ispitivanja svojstava RBP4, a

tijekom istraživanja su, između ostaloga, utvrdili i kako je RBP4 u urinu zdravih osoba zastupljen u jako maloj količini, dok je u urinu osoba s ozljedom bubrežnih kanalčića među najzastupljenijim proteinima³². Kao potencijalni biomarker ozljede bubrega, RBP4 se istražuje još od 1987. godine kada su Bernard i suradnici proveli istraživanje s ciljem utvrđivanja prikladnosti RBP4 kao biomarkera ozljede proksimalnih kanalčića³³. Tijekom istraživanja pratili su razinu RBP4 u urinima pacijenata s ozljedom bubrežnih kanalčića nastalom zbog različitih uzroka, uključujući rhabdomiolizu, primjenu antibiotika ili trovanje različitim kemikalijama, te su zaključili kako je RBP4 adekvatan biomarker za rano otkrivanje ozljede bubrežnih kanalčića.

Jedno od novijih istraživanja vezanih za RBP4 provedeno je 2015. godine kada su Gonzales-Calero i suradnici proučavali biomarkere ozljede bubrega te su istražili njihov potencijal u predviđanju oporavka³¹. U istraživanju su analizirali uzorke urina osoba s dijagnosticiranom akutnom ozljedom bubrega te uzorke urina zdravih osoba koji su prikupljeni tijekom određenog vremenskog razdoblja: unutar prvih 48 sati od postavljanja dijagnoze, zatim sedmi dan nakon postavljanja dijagnoze, te prilikom otpuštanja iz bolnice. Rezultati istraživanja potvrdili su kako se razina RBP4 u urinu može koristiti kao biomarker akutne ozljede bubrega, a također je utvrđeno i kako se može koristiti za predviđanje i praćenje tijeka oporavka. Na temelju svih dosadašnjih istraživanja danas se pretpostavlja kako je RBP4 vjerojatno najosjetljiviji među dosad ispitivanim potencijalnim biomarkerima ozljede proksimalnih kanalčića³⁰. Naše istraživanje po prvi put sugerira vezu između RBP4 i toksičnih učinaka vankomicina na bubrežnu funkciju te predlaže kako bi RBP4 mogao biti novi potencijalni biljeg za detekciju ozljede bubrega uzrokovane vankomicinom.

Nadalje, naši su rezultati ukazali na moguću ulogu citoskeletnog keratina 1 tipa II u ozljedi bubrega uzrokovanoj vankomicinom. Keratin 1 je protein veličine 67 kDa koji pripada velikoj skupini različitih keratina koji dijele sličnu strukturu^{23,34}. Svim keratinima, uključujući i keratinu 1, zajednička je osnovna središnja domena građena od ~310 aminokiselina koja ima oblik α uzvojnice³⁴. Prema razlikama u izoelektričnoj točki, kera-

tini se mogu podijeliti na dvije osnovne skupine: keratine tipa I (kisele keratine) te keratine tipa II (bazične i neutralne keratine)³⁴⁻³⁶. Jedinstvena karakteristika keratina je stvaranje heterodimera koji uvijek nastaju vezanjem jednog od keratina tipa I s jednim od keratina tipa II^{34,37}.

Keratin 1 koji pripada skupini keratina tipa II najčešće se veže s keratinom 10 iz skupine keratina tipa I, uglavnom putem hidrofobnih interakcija između α uzvojnica^{34,38}. Zanimljivo je uočiti da smo, osim keratina 1 tipa II također identificirali i keratin 10 tipa I u urinu pacijentice s kliničkim znakovima ozljede bubrega uslijed terapije vankomicinom, što sugerira moguću vezu između tih dvaju proteina u mehanizmima renalne toksičnosti vankomicina. Heterodimeri keratina izgrađuju intermedijarne filamente koji čine citoskelet kod epitelnih stanica, pa je njihova najvažnija uloga održavanje mehaničke stabilnosti epitelnih stanica koje oblažu tjelesne šupljine i površine različitih organa, uključujući kožu, probavni sustav i bubrega^{34,35,37,39}. Osim održavanja mehaničke stabilnosti epitelnih stanica, također je dokazano kako keratini mogu regulirati prepisivanje gena, sintezu proteina, unutarstanično signaliziranje, proces apoptoze te proces oporavka epitelnih stanica od ozljede³⁴⁻³⁷. Različiti keratini nisu jednako ekspimirani u svim epitelnim stanicama, već su u različitim vrstama epitelnih stanica i u različitim fazama njihove diferencijacije prisutni točno određeni keratini^{34,35}.

Keratini koji su prisutni u epitelnim stanicama bubrežnih kanalića do danas su slabo istraženi, a prema trenutno dostupnim podacima najzastupljeniji su keratin 7, keratin 8, keratin 18 i keratin 19³⁵. Budući da je keratin 1 kao sastavni dio heterodimera keratina 1 i keratina 10 karakterističan za stanice kože, odnosno suprabazalne epidermalne keratinocite u posljednjoj fazi diferencijacije, u dvodimenzionalnoj gel elektroforezi često se smatra kontaminacijom³⁴. Zanimljivo je istaknuti da je prisutnost keratina 1 u bubrezima, odnosno staničnim linijama bubrežnih stanica također detektirana u nekoliko različitih istraživanja. U jednoj od tih studija koju su 2015. godine proveli Li i suradnici na HK-2 stanicama (ljudskim epitelnim stanicama proksimalnih kanalića) keratin 1 pronađen je i identificiran kao jedan od proteina čija se ekspresija mijenja nakon izloženosti

stanica vankomicinu⁴⁰. Proučavane HK-2 stanice bile su tretirane vankomicinom tijekom 24 sata, što je dovelo do smanjenja razine keratina 1 u tretiranim u odnosu na netretirane stanice. Kako je otprije poznato da stanice HK-2 imaju neke funkcije primarnih epitelnih stanica proksimalnih kanalića iz organizma, no one funkcionalno i morfološki ipak nisu potpuno jednake⁴¹, za identifikaciju potencijalnih novih biomarkera akutne ozljede bubrega uzrokovane lijekovima analiza urina smatra se pouzdanijim pristupom.

U najnovijem istraživanju iz 2016. godine Djurdjaj i suradnici proučavali su uzorke tkiva mišjih i ljudskih bubrega te uzorke ljudskog urina kako bi istražili promjene u ekspresiji keratina kod akutne ozljede bubrega³⁵. U početnoj fazi istraživanja koristili su više različitih mišjih modela ozljede bubrega s različitim mehanizmima nastanka ozljede, poput ishemije, tubulointersticijske fibroze uzrokovane opstrukcijom, nefropatije uzrokovane adeninom, nefropatije uzrokovane folnom kiselinom te progresivnog glomerulonefritisa s proteinurijom i intersticijskom fibrozom. Budući da su prema trenutno dostupnim literaturnim podacima u bubrezima najzastupljeniji keratin 7, keratin 8, keratin 18 i keratin 19, znanstvenici su proučavali promjenu ekspresije upravo tih keratina. Rezultati svih provedenih analiza pokazali su kako se razina proučavanih keratina u stanicama bubrežnih kanalića povećala 20 – 40 puta kod različitih mišjih modela akutne ozljede bubrega, te kako je do povećanja ekspresije došlo ubrzo nakon nastanka ozljede bubrega. Dobiveni rezultati potvrđeni su i na uzorcima tkiva zdravih i ozlijeđenih ljudskih bubrega. Također je kao važno otkriće istaknuta ekspresija proučavanih keratina nakon nastanka ozljede bubrega i u stanicama distalnih kanalića u kojima prije ozljede ovi keratini nisu bili detektirani, što potvrđuje prijašnja opažanja kako epitelne stanice ljudskih bubrega tijekom nastanka ozljede mogu izražavati nove, odnosno drugačije vrste keratina^{34,35}.

Stoga bi keratin 1 tipa II mogao biti potencijalni biomarker ozljede bubrega izazvane vankomicinom s obzirom na to da je naša studija pokazala njegovu ekspresiju samo u urinu pacijentice kod koje je tijekom terapije došlo do pojave kliničkih znakova akutne ozljede bubrega. Također je zanimljivo to što smo keratin 1 identificirali kao 2 različite točke

na gelu dobivenom dvodimenzionalnom gel elektroforezom. Razlog tome bi moglo biti njegovo proteolitičko cijepanje na dvije manje podjedinice kao posljedica aktivnosti urinarnih proteaza. Slično tome, prilikom proučavanja keratina 18 iz urina kao potencijalnog biomarkera akutne ozljede bubrega, Djudjaj i suradnici³⁵ također su uočili kako su na membrani dobivenoj western blot analizom uzoraka urina vidljiva dva signala koji predstavljaju keratin 18, odnosno dva različita fragmenta keratina 18. Osim toga, signal koji je predstavljao fragment manje mase bio je jače izražen od signala koji je predstavljao fragment veće mase, što je također slučaj i u našoj studiji.

Razlika u izoelektričnoj točki koju smo uočili između dva fragmenta keratina 1 može nastati zbog različitih posttranslacijskih modifikacija, a prema smjeru pomaka mogli bismo zaključiti kako je kod keratina 1 na fragmentu manje mase došlo do fosforilacije⁴². Fosforilacija je dokazana posttranslacijska promjena kod keratina, uključujući i keratin 1, a u istraživanju koje su proveli Djudjaj i suradnici također je opaženo kako prilikom akutne ozljede bubrega dolazi do značajno povišene fosforilacije svih proučavanih keratina^{35,43}. Na temelju toga možemo zaključiti kako je naša pretpostavka o fosforilaciji keratina 1 opravdana. Kako se detekcija keratina 1 u proteomskim analizama najčešće veže uz kontaminaciju uzorka, izuzetno je važno provesti daljnja istraživanja u kojima će njegova ekspresija biti izmjerena u urinu većeg broja pacijenata na terapiji vankomicinom, kod kojih je došlo do ozljede bubrega.

ZAKLJUČAK

Rezultati pilot studije prikazane u ovom radu pokazali su da je dvodimenzionalna gel elektroforeza u kombinaciji s masenom spektrometrijom adekvatan metodološki pristup za detekciju novih urinarnih biomarkera akutne ozljede bubrega s obzirom na postignutu osjetljivost i rezoluciju. Usporedba proteomskih profila pacijentica na terapiji vankomicinom sa i bez kliničkih znakova akutne ozljede bubrega otkriva kako su razlike u količini i sastavu urinarnih proteina vidljive treći, a naročito izražene sedmi dan terapije. Dobiveni rezultati potvrđuju već ranije dokazanu ulogu proteina NGAL kao biomarkera akutne ozljede

bubrega te sugeriraju da bi proteini RBP4 i citoskeletni keratin 1 tipa II mogli biti novi potencijalni biljezi ozljede bubrega zbog terapije vankomicinom. Potrebna su daljnja istraživanja na većem broju pacijenata na terapiji vankomicinom kod kojih bi se kontinuirano pratila bubrežna funkcija i ishod liječenja kako bi se mogao utvrditi dijagnostički potencijal rezultata dobivenih u ovoj studiji.

ZAHVALE

Ovaj rad izrađen je korištenjem znanstvene opreme nabavljene u okviru projekta „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci” koji je sufinancirala Europska unija iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR). Provedeno istraživanje financirano je sredstvima potpore znanstvenim istraživanjima Sveučilišta u Rijeci broj 13.11.2.1.12 i 13.11.1.1.11.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Declodet E, Maartens G. Drug-induced renal injury: main article. *Contin Med Educ* 2011;29:252-5.
2. Pannu N, Nadim MK. An overview of drug-induced acute kidney injury. *Crit Care Med* 2008;36:S216-23.
3. Rubinstein E, Keynan Y. Vancomycin Revisited – 60 Years Later. *Front Public Health* 2014;2:1-7.
4. Walsh CT, Fisher SL, Park I-S, Pahalad M, Wu Z. Bacterial resistance to vancomycin – five genes and one hydrogen bond tell the story. *Chem Biol* 1996;3:21-8.
5. Elyasi S, Khalili H, Dashti-Khavidaki S, Mohammadpour A. Vancomycin-induced nephrotoxicity: mechanism, incidence, risk factors and special populations. A literature review. *Eur J Clin Pharmacol* 2012;68:1243-55.
6. Bruniera FR, Ferreira FM, Savioli LR, Bacci MR, Feder D, da Luz Gonçalves Pedreira M et al. The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects: a review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015;19:694-700.
7. Dieterich C, Puey A, Lyn S, Swezey R, Furimsky A, Fairchild D et al. Gene Expression Analysis Reveals New Possible Mechanisms of Vancomycin-Induced Nephrotoxicity and Identifies Gene Markers Candidates. *Toxicol Sci* 2008;107:258-69.
8. Fuchs TC, Hewitt P. Biomarkers for Drug-Induced Renal Damage and Nephrotoxicity—An Overview for Applied Toxicology. *AAPS J* 2011;13:615-31.
9. Annigeri RA. Urinary biomarkers in acute kidney injury. *Apollo Med* 2013;10:36-40.
10. Peres LAB, Dantas da Cunha Júnior A, Schäfer AJ, da Silva AL, Ditzel Gaspar A, Scarpari DF et al. Biomarkers of acute kidney injury. *J Bras Nefrol* 2013;35:229-36.
11. Decramer S, Gonzalez de Peredo A, Breuil B, Mischak H, Monsarrat B, Bascands J-L et al. Urine in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2008;7:1850-62.

12. Wu J, Chen Y, Gu W. Urinary proteomics as a novel tool for biomarker discovery in kidney diseases. *J Zhejiang Univ – Sci B Biomed Biotechnol* 2010;11:227-37.
13. Bellei E, Monari E, Cuoghi A. Discovery by a proteomic approach of possible early biomarkers of drug-induced nephrotoxicity in medication-overuse headache. *J Headache Pain* [Internet]. 2013;14. [cited 2016. Mar 17]. Available from: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1129-2377-14-6.pdf>
14. MacLean FR, Skinner R, Hall AG, English M, Pearson AD. Acute changes in urine protein excretion may predict chronic ifosfamide nephrotoxicity: a preliminary observation. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998;41:413-6.
15. Rouse R, Siwy J, Mullen W. Proteomic Candidate Biomarkers of Drug-Induced Nephrotoxicity in the Rat. *PLoS ONE* [Internet]. 2012;7. [cited 2016. Apr 14]. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0034606>.
16. Kalantari S, Jafari A, Moradpoor R, Ghasemi E, Khalkhal E. Human Urine Proteomics: Analytical Techniques and Clinical Applications in Renal Diseases. *Int J Proteomics* 2015;2015:1-17.
17. Dihazi H. The urinary proteomics: a tool to discover new and potent biomarkers for kidney damage. *J Int Fed Clin Chem Lab Med* 2009;20:82-91.
18. Bramham K, Mistry HD, Poston L, Chappell LC, Thompson AJ. The non-invasive biopsy--will urinary proteomics make the renal tissue biopsy redundant. *Q J Med* 2009;102:523-38.
19. GE Healthcare Bio-Sciences AB (SE). ImageMaster 2D Platinum User Manual. AB ed. Geneva: Swiss Institute of Bioinformatics; 2009.
20. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2007;1:2856-60.
21. Gene – NCBI [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. c2003 [cited 2016 Sep 11]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>.
22. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 2002;10:1033-43.
23. UniProtKB [Internet]. Hinxton, Geneva, Washington (DC): The UniProt Consortium. c2003 [cited 2016 Sep 11]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/>.
24. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. *Biomark Med* 2010;4:265-80.
25. Mishra J. Amelioration of Ischemic Acute Renal Injury by Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:3073-82.
26. Mishra J. Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Novel Early Urinary Biomarker for Ischemic Renal Injury. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2534-43.
27. Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol* 2004;307:15.
28. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A, Group nml. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2009;54:1012-24.
29. Haase-Fielitz A, Haase M, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury: a critical evaluation of current status. *Ann Clin Biochem Int J Biochem Lab Med* 2014;51:335-51.
30. Norden AGW, Lapsley M, Unwin RJ. Urine Retinol-Binding Protein 4. *In: Makowski GS (ed). Advances in Clinical Chemistry*. Cambridge (MA): Elsevier, 2014;85-122.
31. Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, Ramos-Barron A. Urinary Kininogen-1 and Retinol binding protein-4 respond to Acute Kidney Injury: predictors of patient prognosis?. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6. [cited 2016 Sep 12]. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep19667>.
32. Peterson PA, Berggard I. Isolation and properties of a human retinol-transporting protein. *J Biol Chem* 1971;246:25-33.
33. Bernard AM, Vyskocil AA, Mathieu P, Lauwerys RR. Assessment of urinary retinol-binding protein as an index of proximal tubular injury. *Clin Chem* 1987;33:775-9.
34. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 2008;129:705-33.
35. Djurdjaj S, Papatotiriou M, Bülow RD, Wagnerova A, Lindenmeyer MT, Cohen CD et al. Keratins are novel markers of renal epithelial cell injury. *Kidney Int* 2016;89:792-808.
36. Bragulla HH, Homberger DG. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat* 2009;214:516-59.
37. Snider NT. Kidney keratins: cytoskeletal stress responders with biomarker potential. *Kidney Int* 2016;89:738-40.
38. Bray DJ, Walsh TR, Noro MG. Complete Structure of an Epithelial Keratin Dimer: Implications for Intermediate Filament Assembly. *PLOS ONE* [Internet]. 2015;10. [cited 2016 Sep 14]. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0132706>.
39. Atlas-of-Science.org [Internet]. Sollentuna (SE): AoS Nordic AB. c2016-08 [cited 2016 Sep 8]. Available from: <http://atlasofscience.org/new-way-to-detect-kidney-injury-using-keratins/>.
40. Li Z-L, Zhou S-F. A SILAC-Based Approach Elicits the Proteomic Responses to Vancomycin-Associated Nephrotoxicity in Human Proximal Tubule Epithelial HK-2 Cells. *Molecules* 2016;21:148.
41. Tasnim F, Deng R, Hu M, Liou S, Li Y, Ni M et al. Achievements and challenges in bioartificial kidney development. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2010;3:1.
42. Bio-Rad [Internet]. Hercules (CA): Bio-Rad Laboratories, Inc. c(unknown) [cited 2016 Sep 13]. Available from: <http://www.bio-rad.com/en-hr/applications-technologies/2-d-electrophoresis-analysis>.
43. Steinert PM. The Dynamic Phosphorylation of the Human Intermediate Filament Keratin 1 Chain. *J Biol Chem* 1988;263:13333-9.