

Значение протеомного состава мочи при заболеваниях мочевыводящих путей (обзор литературы)

Н.Б. Захарова¹, Л.Х. Пастушкова², И.М. Ларина², Д.Н. Каширина², Р.Н. Лях¹, В.М. Попков¹

¹ФГБУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского Минздрава России

²ФГБУН ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН

Сведения об авторах:

Захарова Н.Б. – ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского», ЦНИЛ; Россия; e-mail: lipidgordon@mail.ru

Zakharova N.B. – Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Central Research Laboratory; Russia; e-mail: lipidgordon@mail.ru

Пастушкова Л.Х. – Институт медико-биологических проблем РАН; e-mail: lpastushkova@mail.ru

Pastushkova L. Kh. – Institute of Biomedical Problems, SSC RAS; e-mail: lpastushkova@mail.ru

Ларина И.М. – Институт медико-биологических проблем РАН; e-mail: irina.larina@gmail.com

Larina I.M. – Institute of Biomedical Problems, SSC RAS; e-mail: irina.larina@gmail.com

Каширина Д.Н. – Институт медико-биологических проблем РАН; e-mail: i.daryakudryavtseva@mail.ru

Kashirina D.N. – Institute of Biomedical Problems, SSC RAS; e-mail: i.daryakudryavtseva@mail.ru

Лях Р.В. – ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского», ЦНИЛ; Россия; e-mail: romlachv@gmail.com

Lachv R.V. – Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Scientific Research Institute of Fundamental Clinical Urology; e-mail: romlachv@gmail.com

Попков В.М. – ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского», кафедра урологии, НИИ уронефрологии; e-mail: sgmu.ru

Popkov V.M. – Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Scientific Research Institute of Fundamental Clinical Urology; e-mail: sgmu.ru

В настоящее время развитие методов персонализированной медицины (ПМ) основано на выборе диагностических, лечебных и профилактических средств, которые были бы оптимальными для пациента, с учетом его генетических особенностей. Для внедрения диагностических подходов персонализированной медицины необходим отбор надежных, интерпретируемых и эффективных биомаркеров и создание на их основе диагностических панелей. Не менее важно и формирование инфраструктуры для тестирования биомаркеров [1,2].

Одним из направлений совершенствования методов персонализированной медицины является клиническая протеомика, задачи которой – поиск биомаркеров различных заболеваний. Прежде всего – это протеомика жидкостей тела человека, крови и мочи [2]. Белки, выявляемые в моче, имеют различное происхождение: одни из них фильтруются из плазмы крови, другие по-

ступают из мочевого тракта. Считается, что белки мочи не-плазменного происхождения составляют примерно 50% от всех белков мочи. К ним относятся белки, поступающие из мочеточника, мочевого пузыря, мочеиспускательного канала, добавочных половых желез и почек [3]. Сейчас протеомными методами в моче обнаруживают более 3 тыс. различных белков [4]. Это открывает значительные возможности для поиска биомаркеров, откликающихся на заболевание почек или мочеполового тракта, таких, например, как почечная недостаточность в результате гипертонической и диабетической нефропатии, врожденной обструктивной нефропатии, волчаночном нефрите, уролитиазе и при недержании мочи [5,6,8-17]. Полученные результаты исследования белкового состава мочи подтвердили перспективность использования и диагностическое значение целого ряда мочевых молекулярных маркеров для оценки состояния почечной паренхимы, мочевыводящих путей, заболеваний сердечно-

сосудистой системы и др. [10]. В современных руководствах и клинических рекомендациях, как отечественных, так и зарубежных, до настоящего времени в диагностике заболеваний почек насчитывается только несколько маркеров повреждения паренхимы почек: повышение мочевины, креатинина, электролитные нарушения, снижение скорости клубочковой фильтрации, другие изменения в анализах мочи (альбуминурия, протеинурия и др.) [18-22]. Как показывают многочисленные исследования, высокий сывороточный креатинин не всегда специфичен для повреждения почек. Его уровень может изменяться в зависимости от многих не ренальных факторов (возраст, пол, мышечная масса, статус обезвоживания и др.). Показано, что до 50% ренальных функций может быть утрачено еще до повышения уровня креатинина [22]. То есть уровень креатинина не отражает нарушение функции почек до того момента, пока не разовьется патологическое состояние. Поиск надежных, специ-

фичных, доступных лабораторных маркеров, которые могут широко применяться в клинической практике, на ранних стадиях поражения почек представляет собой одно из актуальных направлений исследований.

Широкое внедрение в клиническую практику методов иммуноферментного анализа в настоящее время привело к появлению целого ряда исследований, в которых повышенные концентрации в моче интерлейкинов IL-1 β , IL-6, IL-8, рецепторного антагониста IL-1 (IL-1RA), фактора некроза опухолей (TNF- α), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), моноцитарного хемотактантного белка-1 (MCP-1) и С-реактивного белка (CRP) в моче, определенные методом иммуноферментного анализа (ИФА), были успешно использованы в качестве показателей активности воспалительного процесса и фиброзной трансформации тубулоинтерстициальной ткани почек при пиелонефритах [19,20,23,24]. Показано, в частности, что количественный анализ IL-6, IL-8, MCP-1, IL-1RA и CRP в моче больных первичным пиелонефритом позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью диагностировать ранние стадии развития воспаления, а VEGF – определить степень ишемии почечной паренхимы и прогнозировать развитие интерстициального фиброза [21,25]. Также выявлено, что определение концентрации ряда цитокинов и CRP в моче может быть широко использовано в клинко-диагностических лабораториях для оценки выраженности воспалительных процессов в мочевыводящих путях и контроля эффективности нефропротективной терапии [22,26]. Установлено, что для диагностики прогрессирования заболеваний почек может быть использовано определение в моче провоспалительных цитокинов и хемокинов, а для оценки ишемии почечной паренхимы – анализ фактора роста эндотелия сосудов и матриксных металлопро-

теиназ (ММП) с помощью коммерческих наборов реагентов для ИФА [21,23,26]. Вышеупомянутые белки мочи приобретают важное клиническое значение и рассматриваются в качестве маркеров тяжести, прогрессирования и исхода заболеваний, приводящих к формированию хронической болезни почек. В экспериментальных и клинических исследованиях определен еще ряд лабораторных маркеров, определяемых в сыворотке крови и моче, которые могут отражать степень повреждения почечной ткани и развитие процессов тубулоинтерстициального фиброза до наличия нарушения функции почек, определяемых рутинными методами, указанными в клинических рекомендациях по диагностике и лечению заболеваний почек [24,25, 26,27]. Так, белок, связывающий витамин D, ретинол-связывающий белок, β 2-микроглобулин и альфа1-микроглобулин, считаются мочевыми маркерами канальцевой дисфункции и позволяют предположить патологическое отклонение от нормальной канальцевой реабсорбции [28,29]. В последние годы предложен ряд биомаркеров, которые определяются и в крови и моче, и могут быть использованы для оценки повреждения почек на ранних стадиях. Большинство биомаркеров представляют собой соединения и белки, экскретируемые канальцевым аппаратом почки при его повреждении различными агентами (бактериальными и т.д.) [30]. Это – цистатин С/Cystatin C в крови, рассматриваемый как потенциальный ранний биомаркер острого повреждения почек. Однако цистатин С в настоящее время не считается непосредственным маркером почечного тубулярного повреждения, а скорее альтернативным креатинину, более точным тестом для оценки скорости клубочковой фильтрации. Также нейтрофильный желатиназно-ассоциированный липокалин/Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), определяемый

в моче, имеет прямую корреляционную связь с уровнями креатинина, величиной СКФ, активностью ферментов мочи (ЛДГ, ЩФ) [31,32]. Молекула почечного повреждения -1 (Kidney injury molecule-1, KIM-1) также имеет высокую чувствительность для выявления формирующегося острого повреждения почек. Уровни KIM-1 в моче относятся к наиболее прогностически значимым маркерам неблагоприятного исхода заболевания. Противовоспалительный цитокин (интерлейкин 18, Urinary interleukin-18 (IL-18) считается маркером агрессивного нефротоксического воздействия проводимой терапии [33]. Перечисленные биомаркеры могут быть включены в рекомендации для оценки степени восстановления функции почек, повторных эпизодов острого повреждения почек или ухудшения течения уже имеющейся хронической болезни почек.

Результаты исследования этих биомаркеров при хронических и злокачественных новообразованиях почек и мочевыводящих путей в динамике дают возможность подобрать больному адекватные методы лечения, позволяющие остановить или замедлить прогрессирование заболевания.

МЕТОДЫ ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА МОЧИ, ОБОРУДОВАНИЕ, ПОСТАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Одной из самых мощных и широко применяемых в целях поиска биомаркеров технологий является масс-спектрометрия, позволяющая получать информацию сразу о сотнях белков. Современные MALDI-TOF и другие масс-спектрометры отличаются высокой производительностью и могут быть оптимизированы к рутинному использованию для подробного анализа пептидов и полимеров. ■

Высококчувствительные масс-спектрометрические методы способствовали получению новых данных о белковом составе жидкостей тела человека как в норме, так и при патологии. Считается, что наиболее значимые успехи в плане практического применения масс-спектрометры имеют в области исследований протеома мочи [34]. Современные методы разделения белковых смесей и определения отдельных компонентов этих смесей с применением масс-спектрометрии позволили определить в образцах мочи человека до 3500 различных белков [35]. Современная диагностика изменений белкового состава мочи с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии в течение ряда лет успешно применяется сотрудниками лаборатории «Протеомики» Института медико-биологических проблем в исследованиях протеомного состава мочи при действии реальных и моделируемых факторов космического полета. Успешно решен ряд сложных проблем, сдерживающих продвижение исследований в физиологии и клинике. Отработанная система пробоподготовки, стандартизирован ее преаналитический этап применительно к такому клиническому биоматериалу, как моча.

Нивелирован целый ряд недостатков программного обеспечения, затрудняющих достоверную интерпретацию результатов. Тщательно разработан весь процесс, требуемый для исследования протеомного состава мочи, включающий:

– **Преаналитический этап** – сбор мочи, методы проведения пробоподготовки. Установлено, что аналитическая воспроизводимость исследования белкового состава мочи масс-спектрометрическими методами не зависит от продолжительности замораживания, образец остается стабильным в течение нескольких лет, даже при хранении при -20 °С. Воспроизводимость поддерживается и в образцах, сохраняемых до 5-6 часов при комнатной темпера-

туре, или до трех дней при 40°С, за счет небольшого количества протеаз в данном биологическом материале. Пробоподготовку для дальнейшего анализа протеомного состава мочи осуществляют согласно стандартному протоколу (протокол обработки мочи для скрининга, HURO-2007, Сеул, Корея) [36].

– **Аналитический этап** – при получении масс-спектров применяют различные хромато-масс-спектрометрические системы. Например, система может состоять из хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., США) и гибридного масс-спектрометра LTQ-FT Ultra (Thermo, Германия). В этом случае хроматографическое разделение смеси белков после трипсинолиза проводят на базе нанопоточного высокоэффективного жидкостного хроматографа (нано-ВЭЖХ) Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, США). Для градиентной хроматографии применяют home-made колонку с использованием капилляра-эммитера (Pico-tip, New Objective Inc., США), описанную Y. Ishihama и др. [37].

Как правило, из каждого образца мочи получают два образца триптической смеси, которую анализируют трижды на масс-спектрометре. Для последующего анализа отбираются лишь те белки, которые были обнаружены в двух или трех повторах. Целесообразность такой «строгости» оспаривается рядом специалистов, работающих с образцами мочи (частные дискуссии). Их аргументация сводится к доводу, что если в образце однажды (в одном из прогонов) был достоверно идентифицирован тот или иной белок, то это свидетельствует о том, что он есть в образце, и скорее надо критиковать те масс-спектрометрические прогоны, в которых он не выявлялся. В качественной протеомике мочи о динамике изменения протеома судят по частоте встречаемости белков в образцах, считая, что факт обнаружения белка в образце, при сохранении чувствитель-

ности LC/MS метода, связан с его концентрацией.

– **Постаналитический этап** – применение комплекса современных биоинформационных технологий, включающих в себя: 1. Поиск и идентификация белков по базе данных IPI-human при помощи программы Mascot; 2. Обработка с помощью уникальной программы, разработанной в лаборатории профессора Е.Н. Николаева [38], результатов Mascot-поиска; 3. Применение комплекса биоинформационных ресурсов для определения места образования, функции выявленных в моче белков, а также для анализа биологических процессов, в которых они участвуют; 4. Анализ тканеспецифичности экспрессии и тканевой локализации белков; определение молекулярных функций, биологических процессов и клеточной локализации; сверхпредставленности биологических процессов, молекулярных функций, связанных с выявленными белками; построение ассоциативных генных сетей между белками.

Для определения места образования в организме и биологической функции выявленных белков, а также для анализа биологических процессов, в которых они участвуют, применяют следующие биоинформационные ресурсы: UniProtKB [<http://www.uniprot.org/>], TiGER [<http://-bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/>], Gene Ontology [<http://geneontology.org/>]. Для определения сверхпредставленных биологических процессов используют программу BiNGO со следующими параметрами: статистический критерий — гипергеометрический критерий; поправка на множественное сравнение Бен-жамина Хохберга; уровень значимости: 0,05; референсная выборка – полная аннотация, как референсная выборка; файл онтологии — Custom, Gene Ontology (format-version:1.2 data-version: 2013-08-21); организм/аннотация: GO Annotation_Human (Submission Date: 8/5/2013).

ТРУДНОСТИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗУЧЕНИЯ БЕЛКОВОГО СОСТАВА МОЧИ ЧЕЛОВЕКА ПРОТЕОМНЫМИ МЕТОДАМИ

Существуют объективные и до сих пор не преодоленные трудности в интерпретации результатов исследования протеома мочи, в определенной степени сдерживающие широкое использование технологий протеомики в клинической области. Их можно условно разделить на следующие категории.

1. Высокая индивидуальная («продольная») вариабельность протеома мочи. При сопоставлении белкового состава образцов мочи одного и того же человека (здорового или пациента в процессе диагностики, или мониторинга терапии) необходимо увидеть значимые изменения в составе и по ним сделать заключение того или иного характера. При этом нельзя не принимать во внимание, что белковый состав мочи, главным образом, зависит от:

- белкового состава крови (вариабельность которого, при изучении методами протеомики на основе масс-спектрометрии, составляет около 25% [38]. По данным О.М. Трифоновой индивидуальная вариабельность белкового состава крови здоровых добровольцев в контролируемых условиях, исследованная на протяжении 3 недель, составила $22 \pm 13\%$ [39].

- вариабельность белкового состава мочи зависит также от актуальной функции почки, как эффекторного органа поддержания водно-электролитного гомеостаза внутренней среды организма. Этот аспект практически не исследован, за исключением небольшого числа работ, выполненных с участием здоровых добровольцев или пациентов разных нозологических групп.

Сообщается, что «продольная» вариабельность белкового состава мочи при масс-спектрометрическом исследовании составляет 45%, или достигает 58% [40, 41]. По нашим

данным, полученным при исследовании здоровых добровольцев в контролируемых условиях потребления основных нутриентов, жидкости, двигательной активности, состава атмосферы в замкнутом объекте – даже численный состав белков в моче может сильно варьировать при сравнении двух последовательных недель наблюдения (рис. 1) [42]. При исследовании проб мочи 30,7% из числа выявляемых прямым профилированием пиков у здорового человека имеют «продольную» вариабельность, вдвое превышающую аналитическую на протяжении времени обследования в 3 месяца [43].

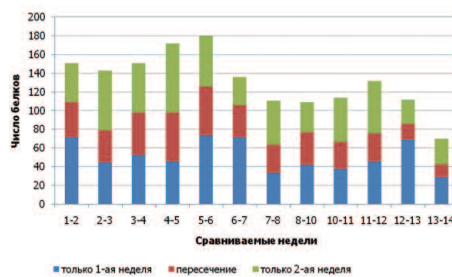


Рис. 1. Изменения белкового состава мочи, собранной еженедельно (при сравнении двух последовательных недель)

ТРУДНОСТИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПРОТЕОМИКИ МОЧИ

Получение количественных данных об экскреции различных белков почкой методами протеомики на основе масс-спектрометрии сейчас абсолютно реально. Разработано множество методических подходов, дающих воспроизводимые и точные, в том числе количественные, данные по протеому мочи человека [44,45,46]. Тем не менее, эти прорывы в приборостроении, разработке различных методов намного опередили возможности использования их результатов медиками в диагностических и других целях.

Еще два десятилетия назад были получены результаты исследований, которые говорили о возможности увеличения экскреции белка,

зависящей от некоторых непатологических факторов, таких как интенсивная физическая нагрузка, ортостаз, лихорадка, эмоциональный стресс. Увеличение экскреции некоторых белков почкой может наступать и при изменении скорости мочеотделения. Тем не менее, факторы регуляции уровня экскреции белка почкой не описаны. Остаются открытыми вопросы о пределах вариабельности и механизмах влияния процессов, лежащих в основе мочеобразования, на уровень экскреции белка в норме. Это обстоятельство не дает возможности установить референсные интервалы для экскреции различных белков с мочой. Выяснение условий развития физиологической протеинурии представляет безусловный интерес, как для нормальной физиологии, так и для практической медицины.

Это затруднение использования количественных протеомных данных имеет и другой аспект. Как отмечалось выше, почка является исполнительным органом физиологической системы, которая поддерживает важнейшие гомеостатические константы внеклеточной жидкости организма. Формирование мочи того или иного состава в каждый конкретный момент времени определяется насущными актуальными задачами, входящими в эту функцию почки. Достаточно часто, например, при изменении уровня поступления жидкости в организм (увеличение или уменьшение в силу разных причин объема выпиваемой жидкости), или во время длительного перерыва в питье (ночной сон), а также в других обычных условиях жизни – почка усиливает выведение воды, или задерживает воду, реабсорбируя ее назад, в организм. Эти реакции по разбавлению или концентрированию мочи, а также изменению ее электролитного состава (концентраций Na, K, Ca, Cl) не могут не влиять на содержание в моче различных белков. Эти предположения находят экспериментальное подтверждение. ■

Так, А.В. Кутиной в экспериментах со здоровыми добровольцами во время введения водной нагрузки показано, что скорость экскреции альбумина остается в пределах нормальных значений – до 20 мкг/мин, а суммарная экскреция белков растет [47]. Это свидетельствует о выраженной селективности деятельности канальцев. Т.е. экскреция альбумина за 2 ч после приема воды возросла в меньшей степени, чем суммарная экскреция белков, что приводит к тому, что доля альбуминов в экскретируемом общем белке снижается с 4,4% до 1,5%. Следовательно, либо прирост выделения белков зависит от неодинакового увеличения фильтрации различных белков в клубочках, либо у человека достаточно велико значение максимальной реабсорбции альбуминов в проксимальном канальце по сравнению с другими белками, и поэтому альбумины в большей степени реабсорбируются, чтобы быть сохраненными для нужд организма. По-видимому, при водной нагрузке и увеличении диуреза растет выделение белков почкой и меняется соотношение различных белков в моче по сравнению с исходным периодом [47]. Сравнительное исследование экскреции белка

почкой при разных типах диуреза у животных (*Rattus norvegicus* var. *albino*, *Rana temporaria*) и человека свидетельствует, что полиурия сопровождается увеличением выведения с мочой белков, которое, вероятно, зависит от участия V1-рецепторов, изменения продукции N0, но не ангиотензина II [48].

Таким образом, учет скорости мочеотделения при клинической оценке протеинурии остается актуальной задачей. Но, кроме того, современные математические модели, разработанные на основе экспериментальных данных, полученных в опытах *in vivo* на изолированных перфузируемых почках, выделенных нефронах и т.д., показывают, что как проницаемость гломерулярного фильтра для белков, так и скорость реабсорбции белков в проксимальном канальце, весьма чувствительны к изменениям скорости гломерулярной фильтрации (СГФ) и внутриклубочкового давления. Следовательно, все факторы и условия, включая действие фармакологических агентов, оказывающих влияние на СГФ и давление внутри клубочка, будут влиять на скорость экскреции белков почкой и на состав выводимых белков. Эти данные указывают, что необходима не только разработка требований по

стандартизации условий сбора образцов мочи для количественного протеомного исследования с целью «продольного» или группового сравнения, но и стратификация этих требований для различных актуальных условий деятельности почки пациента [49].

В целом, исследования протеомного состава мочи, по нашему мнению, должны считаться перспективными с точки зрения возможности выявления новых, надежных и специфических маркеров в моче пациентов с хроническими заболеваниями почек в начальных стадиях доклинического повреждения почек. Впоследствии, для определения данной группы мочевых молекулярных маркеров могут быть разработаны отечественные экспресс-методы (point of care) «у постели больного». То есть результатом поисковых, на данном этапе, исследований станет разработка новых технологий бесприборной диагностики начальных стадий поражения почек и мочевыводящих путей или отечественных мочевых полосок. В будущем данная отечественная бесприборная диагностика может стать методом диагностики заболеваний почек, доступным для любого человека, в том числе заменяющим нефробиопсию. ■

Ключевые слова: *клиническая протеомика, биомаркеры, протеом мочи, масс-спектрометрия.*

Key words: *clinical proteomics, biomarkers, urine proteome, mass spectrometry.*

Резюме:

Одним из направлений совершенствования методов персонализированной медицины является клиническая протеомика, участвующая в работе по открытию биомаркеров различных заболеваний. Внедрение в клиническую практику методов иммуноферментного анализа показало, что целый ряд мочевых белков может быть использован для оценки состояния почечной паренхимы, мочевыводящих путей, заболеваний сердечно-сосудистой системы и др. Новой и одной из самых мощных и широко применяемых в целях поиска биомаркеров технологий является масс-спектрометрия, позволяющая получать информацию сразу о сотнях белков. Современная диагностика изменений белкового состава мочи с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии в течение ряда лет успешно применяется в исследованиях протеомного состава мочи при действии реальных и моделируемых факторов космического полета. Успешно решен ряд сложных проблем,

Summary:

The importance of the proteomic composition of urine in urinary tract diseases. Literature review

N.B. Zaharova, L.H. Pastushkova, I.M. Larina, D.N. Kashirina, R.N. Lyah, V.M. Popkov

Clinical proteomics is one of the directions of the development of methods of personalized medicine, since it takes part in revealing the biological markers of different diseases. The incorporation of immunoassays into the methods of clinical assessment has demonstrated that a series of urinary proteins may be used for the evaluation of the renal parenchyma, urinary tracts, cardiovascular diseases, etc. Mass-spectrometry is a new and one of the most powerful technologies used for the search for biomarkers, which can obtain information about hundreds of proteins simultaneously. Modern diagnostics of the changes in urinary protein composition using MALDI-TOF mass-spectrometry is being successfully applied during the last

сдерживающих продвижение исследований в физиологии и медицине. Отработана система пробоподготовки, стандартизирован её преаналитический этап применительно к такому клиническому биоматериалу, как моча. Нивелирован целый ряд недостатков программного обеспечения, затрудняющих достоверную интерпретацию результатов. В настоящее время требуется разработка требований по стандартизации условий сбора образцов мочи для количественного протеомного исследования с целью «продольного» или группового сравнения, а также для различных актуальных условий деятельности почки пациента. Исследования протеомного состава мочи можно считать перспективными с точки зрения возможности выявления новых, надёжных и специфических маркеров в моче у пациентов с хроническими заболеваниями почек в начальных стадиях их доклинического повреждения.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

years for the proteomic analysis of urine in patients under real or modelled conditions of space flight. A number of complications, which impede the progress of research, have been resolved. Sample preparation procedure has been developed; its preanalytical stage has been standardized for the use of urine as a clinical sample. A series of errors in the software, which impair valid interpretation of results, have been rectified. The development of requirements for the standardization of urine sampling conditions for quantitative proteomic analysis aimed at longitudinal and groups studies. Proteomic analysis of urine claimed to be promising due to the possibility of the detection of new, reliable and specific urinary markers in patients with chronic renal diseases at the preliminary stages of their preclinical damage.

Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сучков С.В., Гнатенко Д.А., Костюшев Д.С., Крынский С.А., Пальцев М.А. Протеомика как фундаментальный инструмент доклинического скрининга, верификации анализов и оценки применяемой терапии. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2013;68(1):65–71. doi:10.15690/vramn201368165-71.
2. Ozer JS., Dieterle F, Troth S, Perentes E, Cordier A, Verdes P. et al. A panel of urinary biomarkers to monitor reversibility of renal injury and a serum marker with improved potential to assess renal function. *Nature Biotechnology* 2010;28:486–494. doi:10.1038/nbt.1627.
3. Coca SG, Parikh CR. Urinary biomarkers for acute kidney injury: perspectives on translation. *Clinical J American Society of Nephrology*. 2008;2(3):481–490. doi:10.2215/cjn.03520807.
4. Thongboonkerd V, Chutipongtanate S, Kanlaya R. Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics: quantity, quality and variability. *Journal of Proteome Research* 2006;1(5):183–191. doi:10.1021/pr0502525.
5. Yoshida Y, Miyazaki K, Kamiie J, Sato M, Okuizumi S, Kenmochi A. et al. Two-dimensional electrophoretic profiling of normal human kidney glomerulus proteome and construction of an extensible markup language (XML)-based database. *Proteomics* 2005;4(5):1083–1096. doi:10.1002/pmic.200401075.
6. Merchant M, Klein JB. Proteomics and diabetic nephropathy. *Seminars in Nephrology* 2007;6(27):627–636. doi:10.1016/j.semnephrol.2007.09.003.
7. Алексеев А.В., Гильманов А.Ж., Гатиятулина Р.С., Ракипов И.Г. Современные биомаркеры острого повреждения почек. *Практическая медицина* 2014;79(3):22–27.
8. Вельков В.В., Резникова О.И. Новые возможности для лабораторной диагностики хронической и острой ренальной дисфункции. *Научно-практический журнал «Клинико-лабораторный консилум»* 2011;39(3):26–30.
9. Глыбочко П.В., Захарова Н.Б., Понукалин А.Н., Гражданов Р.А., Россоловский А.Н., Вараксин Н.А. и др. Диагностическое значение подъема уровня провоспалительных цитокинов в моче при обострении хронического калькулезного пиелонефрита. *Саратовский научно-медицинский журнал* 2011;7(S2):143.
10. Новоселова О.В., Волынчик Е.П., Кононова С.В., Вельков В.В., Михайлов Ю.Е. Клиническое значение качественного и количественного анализа белкового состава мочи. *Лаборатория* 2006;1:7–9.
11. Пролетов Я. Ю., Саганова Е. С., Галкина О. В. Роль некоторых биомаркеров в оценке характера хронического повреждения почек у пациентов с первичными гломерулопатиями. *Нефрология* 2013;1:60–69.
12. Ребров А.П., Захарова Н.Б., Оксеньчук А.Н., Карпова О.Г., Патрикеева Д.А., Попыхова Э.Б. Диагностическое значение определения биомаркеров в сыворотке крови и моче больных системной красной волчанкой. *Клиническая нефрология* 2014;1:10–14.
13. Сереженков А.В., Горелов А.И. Цитокиновый профиль крови пациентов с хроническим пиелонефритом. *Здоровье - основа человеческого потенциала - проблемы и пути их решения* 2013;8(1):510–512.
14. Крайдашенко О.В., Долинная М.А. Роль биомаркеров в оценке характера повреждений почек у больных с гипертонической болезнью. *Клиническая нефрология* 2014;3:23–25.
15. Decramer S. de Peredo AG, Breuil B, Mischak H, Monsarrat B, Bascands J. et al. Urine in clinical proteomics *Molecular Cellular Proteomics* 2008;10(7):1850–1862. doi:10.1074/mcp.r800001-mcp200.
16. Gayathri Gopalan, Veena S. Rao, Vijay V. Kakkar. An overview of urinary proteomics applications in human diseases. *International Journal of High Throughput Screening* 2010;1:183–192. doi:10.2147/ijhts.s13129.
17. Николаев А.Ю. Анализ ведущих факторов прогрессирования хронической болезни почек. *Нефрология и диализ* 2011;13(4):396–400.
18. Вельков В.В. Новые представления о диабетической нефропатии: гиперфильтрация, прерывистая микроальбуминурия, солевой парадокс. *Медицинский алфавит* 2013;3(16):18–36.
19. Захарова Н.Б., Долгов А.Б., Иноземцева Н.Д., Блюмберг Б.И. Биомаркеры инфекционно - воспалительных заболеваний почек и мочевыводящих путей. *Справочник заведующего КДЛ*. 2013;2:48–59.
20. Бобкова И.Н. Клиническое значение определения в моче маркеров эндотелиальной дисфункции и факторов ангиогенеза в оценке тубулоинтерстициального фиброза при хроническом гломерулонефрите. *Терапевтический архив* 2007;6:10–15.
21. Вараксин Н.А., Захарова Н.Б., Понукалин А.Н., Россоловский

- А.Н., Рябичева Т.Г., Офицеров В.И. Цитокины и С-реактивный белок при первичном пиелонефрите: сравнение диагностической значимости концентрации в моче и сыворотке крови. *Новости «Вектор-Бест»* 2012;64(2):3–9.
22. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. *Am J Kid Dis* 2002;39 (suppl 1).
23. Глыбочко П.В., Захарова Н.Б., Понукалин А.Н., Гражданов Р.А., Россоловский А.Н., Вараксин Н.А., Полозов А.Б., Блюмберг Б.И. Значение подъема уровня провоспалительных цитокинов в моче при обострении хронического калькулезного пиелонефрита. *Уральский медицинский журнал* 2011;6(84):121–123.
24. Mischak H, Thongboonkerd V, Schanstra JP, Vlahou A. Renal and urinary proteomics. *Proteomics – Clinical Applications* 2011;5–6(5):211–213. doi:10.1002/prca.v5.5/6.
25. Thongboonkerd V. Study of diabetic nephropathy in the proteomic era. *Contributions to Nephrology* 2011;170:172–183. doi:10.1159/000325657.
26. Попков В.М., Долгов А.Б., Захарова Н.Б., Понукалин А.Н., Вараксин Н.А. Мочевые биомаркеры при остром пиелонефрите. *Саратовский научно-медицинский журнал* 2013;9(1):110–115.
27. Морозов Д.А., Морозова О.Л., Захарова Н.Б., Лакомова Д.Ю. Патогенетические основы и современные проблемы диагностики хронического обструктивного пиелонефрита у детей. *Урология* 2013;2:129–134.
28. Jungbauer CG, Birner C, Jung B, Buchner S, Lubnow M, von Bary C, et al. Kidney injury molecule-1 and N-acetyl- β -D-glucosaminidase in chronic heart failure: possible biomarkers of cardiorenal syndrome. *European Journal of Heart Failure* 2011;10(13):1104–1110. doi:10.1093/eurjhf/hfr102.
29. Ko GJ, Grigoryev DN, Linfert D, Jang HR, Watkins T, Cheadle C. et al. Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI to CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiology* 2010;6(298):1472–1483. doi:10.1152/ajprenal.00619.2009.
30. Nejat M, Pickering JW, Walker RJ, Endre ZH. Rapid detection of acute kidney injury by plasma cystatin C in the intensive care unit. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2010;10(25):3283–3289. doi:10/1093/ndt/gfq176.
31. Белохвостикова Т.С., Орлова Г.М., Фатахова О.А. и др. Липокаин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов, у больных с хронической болезнью почек: клиничко-лабораторные взаимосвязи. *Нефрология и диализ* 2011;13(3):268–269.
32. Shen SJ, Hu ZX., Li QH, Wang SM, Song CJ, Wu DD. et al. Implications of the changes in serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin and cystatin C in patients with chronic kidney disease. *Nephrol (Carlton)* 2014;3(19):29–35. doi:10.1111/nep.12203.
33. Zubowska M, Wyka K, Fendler W, Mlynarski W, Zalewska-Szewczyk B. Interleukin -18 as a Marker of Chronic Nephropathy in Children after Anticancer Treatment. *Disease Markers* 2013;35:811–818. doi:10.1155/2013/369784.
34. He JC, Chuang PY, Ma'ayan A, Iyengar R. Systems biology of kidney diseases. *Kidney International* 2012;1(81):22–39. doi:10.1038/ki.2011.314.
36. Court M, Selevsek N, Matondo M, Allory Y, Garin J, Masselon CD et al., Toward a standardized urine proteome analysis methodology. *Proteomics* 2011;6(11):1160–1171. doi:10.1002/pmic.201000566.
35. Fiedler GM, Baumann S, Leichtle A. Standardized peptidome profiling of human urine by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 2007;3(53):421–428. doi:10.1373/clinchem.2006.077834.
36. Ishihama Y, Rappsilber J, Mann M. Modular stop and go extraction tips with stacked disks for parallel and multidimensional Peptide fractionation in proteomics. *Journal Proteome Research* 2006;4(5):988–994. doi:10.1021/pr050385q.
37. Агрон И.А., Автономов Д.М., Кононихин А.С., Попов И.А., Мошковский С.А., Николаев Е.Н. База данных по точным массово-временным меткам для хромато-масс-спектрометрического анализа протеома мочи. *Биохимия*. 2010;75(4):598–605. doi:10.1134/S0006297910050147
38. Corzett TH, Fodor IK, Choi MW, Walsworth VL, Turteltaub KW, McCutchen-Maloney SL, et al. Statistical analysis of variation in the human plasma proteome. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010;2010:1–12. doi: 10.1155/2010/258494.
39. Трифонова О. П. Оценка пластичности протеома плазмы крови здорового человека в экстремальных условиях жизнедеятельности: Автореф. дис. канд. биол. наук. Москва; 2011. Доступно по: <http://medical-diss.com/docreader/348178/a#>. Ссылка активна на 05.04.2017.
40. Nagaraj N, D'Souza RC, Cox J, Olsen JV, Mann M. Feasibility of large-scale phosphoproteomics with higher energy collisional dissociation fragmentation. *Journal of Proteome Research* 2010;12(9):6786–6794. doi:10.1021/pr100637q.
41. Oh J, Pyo JH, Jo EH, Hwang SI, Kang SC, Jung JH. et al. Establishment of a near-standard two-dimensional human urine proteomic map. *Proteomics* 2004;11(4):3485–3497. doi:10.1002/pmic.200401018.
42. Larina IM, Pastushkova LKh, Tiys ES, Kireev KS, Kononikhin AS, Popov IA, et al. Permanent proteins in the urine of healthy humans during the mars-500 experiment. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology* 2015;1(13):1540001. doi:10.1142/s0219720015400016.
43. Валева О.А., Пастушкова Л.Х., Пахарукова Н.А., Доброхотов И.В., Ларина И.М. Вариабельность протеома мочи здорового человека в эксперименте с 105 суточной изоляцией в гермообъекте. *Физиология человека* 2011;37(3):351–354. doi:10.1134/s0362119711030157
44. Miyamoto M, Yoshida Y, Taguchi I, Nagasaka Y, Tasaki M, Zhang Y. et al. In-depth proteomic profiling of the normal human kidney glomerulus using two-dimensional protein prefractionation in combination with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* 2007;9(6):3680–3690. doi:10.1021/pr070203n.
45. Smith MP, Banks RE, Wood SL, Lewington AJP, Selby PJ. Application of proteomic analysis to the study of renal diseases. *Nature Reviews Nephrology* 2009;12(5):701–712. doi:10.1038/nrneph.2009.183.
46. Mischak H, Rossing P. Proteomic biomarkers in diabetic nephropathy—reality or future promise? *Nephrol Dial Transplant* 2010;9(25):2843–2845. doi:10.1093/ndt/gfq363.
47. Kutina AV, Natochin IuV. An increase in the secretion of total protein and albumin by the human kidney during water diuresis. *Human Physiology* 2009;5(35):612–615. doi:10.1134/s0362119709050144.
48. Marina AS, Kutina AV, Natochin IuV. Physiological analysis of various types of osmotic diuresis. *Russ. Fiziol Zh Im I. M. Sechenova* 2011;97(12):1309–1318. doi:
49. Polkinghorne KR. Detection and measurement of urinary protein. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2006;6(15):625–630. doi:10.1097/01.mnh.0000247502.49044.10.

REFERENCES (1, 7-14, 17-23, 26, 27, 31, 37, 39, 43)

1. Suchkov S.V., Gnatenko D.A., Kostushev D.S., Krynskii S.A., Pal'tsev M.A. Proteomika kak fundamentalnyy instrument doklinicheskogo skrininga, verifikatsii analizov i otsenki primenyaemoy terapii. [Proteomics as a fundamental tool for subclinical screening, tests verification and assessment of applied therapy]. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk* 2013;68(1):65-71. (In Russian)
7. Alekseev A.V., Gilmanov A.Zh., Gatiyatullina R.S., Rakipov I.G. Sovremennyye biomarkeryi ostrogo povrezhdeniya pochek. [Recent biomarkers of acute renal injury]. *Prakticheskaya meditsina* 2014;79(3):22-27. (In Russian)
8. Velkov V.V., Reznikova O.I. Novyye vozmozhnosti dlya laboratornoy diagnostiki hronicheskoy i ostroy renalnoy disfunktsii. [New possibilities for laboratory diagnosis of chronic and acute renal dysfunction]. *Nauchno-prakticheskyy zhurnal «Kliniko-laboratornyy konsilium»* 2011;39(3):26-30. (In Russian)
9. Glybochko P.V., Zaharova N.B., Ponukalin A.N., Grazhdanov R.A., Rossolovskiy A.N., Varaksin N.A. i dr. Diagnosticheskoe znachenie pod'ema urovnya provospalitelnykh tsitokinov v moche pri obostrenii hronicheskogo kalkuleznogo pielonefrita. [Diagnostic value of the increased levels of proinflammatory cytokines in the urine during exacerbation of chronic calculous pyelonephritis]. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal* 2011;7(S2):143. (In Russian)
10. Novoselova O.V., Volyinchik E.P., Kononova S.V., Velkov V.V., Mihalov Yu.E. Klinicheskoe znachenie kachestvennogo i kolichestvennogo analiza belkovogo sostava mochi. [Clinical value of quality and quantitative analysis of albuminous composition of urine]. *Laboratoriya* 2006;1:7-9. (In Russian)
11. Proletov Ya. Yu., Saganova E. S., Galkina O. V. Rol nekotorykh biomarkeryi v otsenke haraktera hronicheskogo povrezhdeniya pochek u patsientov s pervichnyimi glomerulopatiyami. [The role of several biomarkers in estimation of kidney injury in patients with primary glomerulopathies]. *Nefrologiya* 2013;1:60-69. (In Russian)
12. Rebrov A.P., Zaharova N.B., Oksenchuk A.N., Karpova O.G., Patrikeeva D.A., Popyihova E.B. Diagnosticheskoe znachenie opredeleniya biomarkeryi v syivorotke krovi i moche bolnykh sistemnoy krasnoy volchankoy. [Diagnostic value of determination of biomarkers in the serum of blood and urine of patients a system red lupus]. *Klinicheskaya nefrologiya*. 2014;1:10-14. (In Russian)
13. Serezhenkov A.V., Gorelov A.I. Tsitokinovyy profil krovi patsientov s hronicheskim pielonefritom. [The cytokine profile in the blood of patients with chronic pyelonephritis] *Zdorove – osnova chelovecheskogo potentsiala – problemy i puti ih resheniya* 2013;8(1):510-512. (In Russian)
14. Kraydashenko O.V., Dolinnaya M.A. Rol biomarkeryi v otsenke haraktera povrezhdeniy pochek u bolnykh s gipertonicheskoy boleznью. [Role of biomarkers in the estimation of character of damages of buds for patients with hypertensive illness]. *Klinicheskaya nefrologiya* 2014;3:23-25. (In Russian)
17. Nikolaev A.Yu. Analiz veduschikh faktorov progressirovaniya hronicheskoy boleznii pochek. [Analysis of leading factors of progress of chronic illness of buds]. *Nefrologiya i dializ* 2011;13(4):396-400. (In Russian)
18. Velkov V.V. Novyye predstavleniya o diabeticheskoy nefropatii: giperfiltratsiya, preryivistaya mikroalbuminuriya, solevoy paradoks. [New view of diabetic nephropathy: hyperfiltration, intermittent microalbuminuria, saline paradox] *Meditsinskiy alfavit* 2013;3(16):18-36. (In Russian)
19. Zaharova N.B., Dolgov A.B., Inozemtseva N.D., Blyumberg B.I. Biomarkeryi infektsionno – vospalitelnykh zabolevaniy pochek i mochevyivodyaschih putey. [Biomarkers infectious – inflammatory diseases of buds and urinoexcretory ways]. *Spravochnik zaveduyuschego KDL* 2013;2:48-59. (In Russian)
20. Bobkova I.N. Klinicheskoe znachenie opredeleniya v moche markerov endotelialnoy disfunktsii i faktorov angiogeneza v otsenke tubulointerstitsialnogo fibroza pri hronicheskoy glomerulonefrite. [Clinical significance of determination of urine markers of endothelial dysfunction and angiogenesis factors in assessment of tubulointerstitial fibrosis in chronic glomerulonephritis] *Terapevticheskyy arhiv* 2007;6:10-15. (In Russian)
21. Varaksin N.A., Zaharova N.B., Ponukalin A.N., Rossolovskiy A.N., Ryabicheva T.G., Ofitserov V.I. Tsitokiny i S-reaktivnyy belok pri pervichnom pielonefrite: sravnenie diagnosticheskoy znachimosti kontsentratsii v moche i syivorotke krovi. [Cytokines and C-reactive protein in primary pyelonephritis: comparison of diagnostic significance of concentrations in urine and serum] *Novosti «Vektor-Best»* 2012;64(2):3-9. (In Russian)
23. Glybochko P.V., Zaharova N.B., Ponukalin A.N., Grazhdanov R.A., Rossolovskiy A.N., Varaksin N.A., Polozov A.B., Bljumberg B.I. Znachenie pod'ema urovnya provospalitelnykh tsitokinov v moche pri obostrenii hronicheskogo kalkuleznogo pielonefrita [The value of the increased levels of proinflammatory cytokines in the urine during exacerbation of chronic calculous pyelonephritis]. *Uralskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal* 2011;6(84):121-123. (In Russian)
26. Popkov V.M., Dolgov A.B., Zaharova N.B., Ponukalin A.N., Varaksin N.A. Mochevyie biomarkeryi pri ostrom pielonefrite. [Urinary biomarkers in acute pyelonephritis]. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal* 2013;9(1):110-115. (In Russian)
27. Morozov D.A., Morozova O.L., Zaharova N.B., Lakomova D.Yu. Patogeneticheskie osnovy i sovremennyye problemy diagnostiki hronicheskogo obstruktivnogo pielonefrita u detey. [Modern principles of diagnosis and prediction of course of chronic obstructive pyelonephritis in children]. *Urologiya* 2013;2:129-134. (In Russian)
31. Belohvostikova T.S., Orlova G.M., Fatahova O.A. i dr. Lipokain, assotsirovannyiy s zhelatinazoy neytrofilov, u bolnykh s hronicheskoy boleznью pochek: kliniko-laboratornyye vzaimosvyazi. [Neutrophil gelatinase associated lipocalin in patients with chronic kidney disease: clinical and laboratory relationship] *Nefrologiya i dializ* 2011;13(3):268-269. (In Russian)
37. Agron I.A., Avtonomov D.M., Kononihin A.S., Popov I.A., Moshkovskiy S.A., Nikolaev E.N. Baza daniykh po tochnym massovovremennym metkam dlya hromato-mass-spektrometricheskogo analiz proteoma mochi. [Accurate Mass Tag Retention Time Database for Urine Proteom Analysis by Chromatography–Mass Spectrometry] *Biohimiya* 2010;75(4):598-605. (In Russian)
39. Trifonova O. P. [Otsenka plastichnosti proteoma plasmyi krovi zdorovogo cheloveka v eksperimentalnykh usloviyakh zhiznedeyatelnosti]: Cand.Biol.Sci. [Thesis]Moscow; 2011. available from: <http://medical-diss.com/docreader/348178/a#>. Ссылка активна на 05.04.2017.
43. Valeeva O.A., Pastushkova L.H., Paharukova N.A., Dobrohotov I.V., Larina I.M. Variabelnost proteoma mochi zdorovogo cheloveka v eksperimente s 105 sutochnoy izolyatsiey v geremoob'ekte. [Variability of urine proteome in healthy humans during a 105-day isolation in a pressurized compartment]. *Fiziologiya cheloveka* 2011;37(3):98-102. (In Russian)