

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.61-002.3-036.12-07Ж616.633.96

Пастушкова Л.Х.<sup>1</sup>, Захарова Н.Б.<sup>2</sup>, Каширина Д.Н.<sup>1</sup>, Бржозовский А.Г.<sup>1</sup>, Лях Р.В.<sup>2</sup>, Понукалин А.Н.<sup>2</sup>, Ларина И.М.<sup>1</sup>

## ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОМА МОЧИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ

<sup>1</sup>Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ, 410012, Саратов, Российская Федерация

*Проведено клиническое наблюдение и обследование 12 больных хроническим пиелонефритом (ХПН). В первую группу (Г1) вошли пациенты с обострением данного заболевания, в группу сравнения (Г2) – те же больные спустя 1,5–3 мес после завершения лечения без клинических проявлений обострения ХПН. У всех обследованных пациентов не выявлены лабораторные признаки острого почечного повреждения. Дополнительно в дневное время после завтрака проведён сбор мочи в виде свободно отделяемой 2-й фракции и её пробоподготовка, состоящая из этапов восстановления, алкилирования, осаждения белка и протеолиза с использованием трипсина. Полученная полипептидная смесь разделялась при помощи жидкостной хроматографии в трех повторах и анализировалась на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 и гибридного масс-спектрометра LTQ-FT Ultra. Получен список белков с указанием числа пептидов, по которым они были идентифицированы, и параметры достоверности идентификации. Основная часть информации о полученных белках была получена из базы данных UniProt. Идентифицировано и проанализировано 10 белков, достоверно различающихся по встречаемости в клинической группе пациентов в периоде обострения пиелонефрита. Появление данных белков в моче у больных с обострением ХПН позволяет рассматривать их как потенциальные биомаркеры, напрямую связанные с процессами воспаления и повреждения эпителиальной выстилки почечных канальцев.*

**Ключевые слова:** пиелонефрит; мочевые биомаркеры; протеомика; масс-спектрометрия.

**Для цитирования:** Пастушкова Л.Х., Захарова Н.Б., Бржозовский А.Г., Лях Р.В., Понукалин А.Н., Ларина И.М. Особенности протеома мочи при хроническом пиелонефрите. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (7): 397-402. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-397-402>

*Pastyshkova L.Kh.<sup>1</sup>, Zakharova N.B.<sup>2</sup>, Kashirina D.N.<sup>1</sup>, Brzhozovsky A.G.<sup>1</sup>, Lyakh R.V.<sup>2</sup>, Ponukalin A.N.<sup>2</sup>, Larina I.M.<sup>1</sup>*

### FEATURES OF THE PROTEOME OF THE URINE IN CHRONIC PYELONEPHRITIS

<sup>1</sup> Institute of biomedical problems RAN, Russia, 123007 Moscow;

<sup>2</sup> FGBOU "Saratov state medical University n.a. V.I. Razumovsky" Ministry of health of Russia, 410012, Saratov, Russia

*Clinical observation and examination of 12 patients with chronic pyelonephritis (CPN) were performed. The first group (G1) included patients with exacerbation of the disease. In the comparison group (G2) - the same patients after 1.5-3 months after completion of treatment, without clinical manifestations of exacerbation of CPN. Laboratory signs of acute renal damage were not revealed in all examined patients. Additionally, urine was collected in the afternoon after Breakfast, in the form of a freely separated 2nd fraction and its sample preparation, consisting of the stages: recovery, alkylation, protein deposition and proteolysis using trypsin. The resulting polypeptide mixture was separated by liquid chromatography in three repetitions and analyzed on a system consisting of Agilent 1100 chromatograph and ltq-FT ultra hybrid mass spectrometer. A list of proteins was obtained, indicating the number of peptides by which they were identified, and the parameters of its reliability. Most of the information about the obtained proteins was obtained from UniProt databases. Identified and analyzed 10 proteins that differ significantly in occurrence in the clinical group of patients in the period of exacerbation of PN. The appearance of these proteins in urine in patients with exacerbation of chronic PH allows us to consider them as potential biomarkers directly associated with inflammation and damage to the epithelial lining of the renal tubules.*

**Key words:** pyelonephritis, urinary biomarkers, proteomics, mass spectrometry.

**For citation:** Pastyshkova L.Kh., Zakharova N.B., Kashirina D.N., Brzhozovsky A.G., Lyakh R.V., Ponukalin A.N., Larina I.M. FEATURES OF THE PROTEOME OF THE URINE IN CHRONIC PYELONEPHRITIS. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (7): 397-402 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-397-402>

**For correspondence:** N.B. Zakharova, Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Doctor of Medical Science; e-mail: [lipidgormon@mail.ru](mailto:lipidgormon@mail.ru)

#### Information about authors:

Pastushkova L. Kh., <http://orcid.org/0000-0002-2071-0443>

Zakharova N.B., <http://orcid.org/0000-0001-9410-2240>

Kashirina D.N., <http://orcid.org/0000-0002-9646-7275>

Brzhozovsky A.G., <http://orcid.org/0000-0003-1128-1795>

Lyakh R.V., <http://orcid.org/0000-0001-9283>

Larina I.M., <http://orcid.org/0000-0002-1571-2997>

Ponukalin A.N., <https://orcid.org/0000-0003-2547-5654>

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

Received 25.01.2018  
Accepted 15.03.2018

*Введение.* Важный вклад в развитие персонализированной медицины, объединяющей персональные данные человека с результатами лабораторной и инструментальной диагностики, вносит протеомика. Её задачей является существенное расширение списка маркерных молекул, пригодных для раннего обнаружения патологического процесса и мониторинга эффективности лечения [1]. Результаты исследования протеома мочи за последние 5 лет подтвердили диагностическое значение целого ряда мочевых молекулярных маркеров [2, 3]. Исследователями моча отнесена к идеальному источнику клинически значимых биомаркеров. Показано, что изменения протеомного состава крови могут быть с большей чувствительностью обнаружены в моче, чем в самой крови. Это привело к проведению многочисленных исследований, посвящённых поиску биомаркеров, появление которых в моче связано с заболеваниями почек или мочеполового тракта, прежде всего начальных стадий почечной недостаточности в результате гипертонической и диабетической нефропатии, врождённой обструктивной нефропатии и других [5–7].

Поиск надёжных, специфичных, доступных лабораторных маркеров, которые могут широко применяться в клинической практике в ранних стадиях поражения почек, представляет собой одно из актуальных направлений исследований. В многочисленных исследованиях установлено, что высокий сывороточный креатинин (СКр) не специфичен для повреждения почек. Его уровень может меняться в зависимости от многих факторов (возраст, пол, мышечная масса, статус обезвоживания и др.). Показано, что до 50% ренальных функций может быть утрачено ещё до повышения уровня креатинина [8]. Полученные в настоящее время результаты исследований протеома мочи подтвердили диагностическое значение целого ряда белковых маркеров для оценки состояния почечной паренхимы при заболеваниях почек и мочевыводящих путей [9–11]. Об актуальности таких исследований свидетельствуют клинические рекомендации по хронической болезни почек (K/DOQI): «Для выявления почечного повреждения до снижения скорости клубочковой фильтрации (СКФ) при других типах хронического заболевания почек требуются новые маркеры» [12–14, 19]. Мочевая протеомика от небольших исследований переходит к фазе разработки технологий для массового обследования пациентов с хроническими заболеваниями почек.

В последние годы во многих странах мира наблюдается устойчивый рост заболеваемости пиелонефритом (ПН) во всех возрастных группах, особенно у пациентов пожилого возраста [15]. ПН ассоциируется с гломерулярной гиперfiltrацией, протеинурией, опосредованной ренином, гипертензией и снижением СКФ [16, 17]. Прогноз при ПН в решающей степени зависит от раннего и правильного выявления основной причины заболевания и немедленного начала терапии [18, 19].

Актуальность поиска диагностически значимых белковых маркеров в моче при ПН в настоящее время связана с существенными диагностическими проблемами, возникающими при ранней диагностике заболевания. В последние десятилетия всё больше авторов указывают на стёртое и атипичное клиническое течение ПН, что затрудняет своевременную диагностику. Это часто приводит к развитию гнойных форм данного заболевания при остром ПН, а при хроническом течении редко наступает полная ремиссия или излечение. Одной из при-

чин развития тяжелых осложнений ПН является поздняя диагностика вследствие клинически маловыраженного дебюта болезни, скудной симптоматики и длительного периода функциональной сохранности почек, обусловленного их высокой адаптационной способностью. Вместе с тем дистрофические и деструктивные процессы в клетках паренхимы почек возникают задолго до клинической манифестации ПН. Считается, что мониторинг активности патологических процессов, ведущих к развитию повреждения инфекционными агентами почечной паренхимы при ПН, может стать основой в выборе тактики лечения.

Цель данного исследования – оценка достоверности различий между белками, выделяемыми с мочой, по частоте встречаемости в двух периодах: в периоде обострения и при переходе ПН в хроническую форму.

*Материал и методы.* В первую группу (Г1) вошли 6 пациентов с обострением хронического ПН (ХПН) без лабораторных признаков нарушения функции почек, находившихся на амбулаторном лечении в ГУЗ СО «Саратовская городская поликлиника № 9». Среди обследованных были пациенты с характерными клиническими проявлениями заболевания, без сопутствующих воспалительных заболеваний и вредных привычек. Критерием включения в Г1 было наличие у пациентов обострения ХПН, подтверждённого анамнестическими данными, наличием характерной клинической картины в соответствии с результатами инструментальных и лабораторных исследований (УЗИ мочевыводящих путей, общеклинические анализы крови и мочи, бактериологическое исследование мочи). В исследование не включали пациентов с врождённым гидронефрозом, стриктурами мочеточника или лоханочно-мочеточникового сегмента, выраженной сопутствующей общесоматической патологией (сахарный диабет, онкологические заболевания, ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия III–IV стадии, нарушения почечной гемодинамики), перенесёнными ранее хирургическими вмешательствами на почках. Группу сравнения (Г2) составили пациенты группы Г1 через 1,5–3 мес после завершения лечения без клинических проявлений обострения ХПН, находящиеся на этапе амбулаторного поликлинического обследования. Средний возраст пациентов с ХПН (Г1 и Г2) составил 67,8 года. Обследование больных ХПН согласно клиническим рекомендациям включало обзорную рентгенографию и УЗИ почек и мочевых путей, общеклинические анализы крови и мочи, определение СКр и СКФ с помощью расчётного уравнения СКД-ЕР1 (2009). У всех обследованных пациентов не выявлены лабораторные признаки острого почечного повреждения [20].

Все пациенты, включённые в исследование, получали традиционную антибактериальную, противовоспалительную терапию.

Для количественного анализа биомаркеров вторую порцию утренней мочи объёмом не менее 10 мл собирали в специальные стаканы с крышками. Каждый раз мочу собирали в дневное время суток после завтрака в виде свободно отделяемой 2-й фракции, которая в дальнейшем была подготовлена для масс-спектрометрического анализа, в соответствии со стандартным протоколом [14]. Образцы мочи подвергались пробоподготовке, состоящей из этапов восстановления, алкилирования, осаждения белка и протеолиза с использованием трипсина. Полученная полипептидная смесь разделялась при помощи жидкостной хроматографии в трех повторах и

анализировалась на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 («Agilent Technologies Inc.», Санта-Клара, США) и гибридного масс-спектрометра LTQ-FT Ultra («Thermo», Бремен, Германия). На каждый образец выполняли не менее трёх заколов (исследование каждого белка 3 раза увеличивало выборку до 18 величин показателя в каждой группе). В результате был получен список белков, обнаруживаемых в моче, с указанием числа пептидов, по которым они были идентифицированы, а также параметры достоверности идентификации. Основная часть информации о полученных белках была экстрагирована из баз данных UniProt (<http://www.uniprot.org>). Для статистического анализа и определения молекулярных функций и биологических процессов, в которых участвуют белки, использовался программный пакет Perseus.

Различия в клинических данных и клинические переменные сравнивали с помощью ранговых корреляций Спирмена и *t*-критерия. Разницу в частоте встречаемости белка между двумя группами пациентов оценивали с помощью непараметрического теста Краскела – Уоллиса, проведённого в программе Multi Experiment Viewer ( $p \leq 0,05$ ). Для поиска потенциальных биомаркёров обострения ПН анализировали белки, содержащиеся в образцах мочи пациентов в периоде обострения (Г1) и при переходе в хроническую форму заболевания (ГП). При анализе частоты встречаемости белков в моче пациентов двух групп использовали непараметрический критерий Вилкоксона – Манна – Уитни ( $p < 0,05$ ) в программе Multi Experiment Viewer.

**Результаты.** У пациентов группы сравнения комплект идентифицированных белков мочи состоял из 661 протеина, протеом больных – из 533 белков. Сравнение протеомных профилей мочи больных ПН в двух точках и лиц без клинических проявлений обострения ХПН и других воспалительных заболеваний показало, что в каждой из групп имеются как общие, так и специфические для каждой группы белки. В результате данного целевого анализа было выявлено статистически значимое различие ( $p < 0,05$ ) для 10 белков при сравнении больных Г1 и ГП (см. таблицу).

Далее была сформирована ручная аннотация этих белков, выполненная по открытым базам данных.

**Обсуждение.** Период обострения и переход в хроническую форму ПН статистически значимо различался

( $p < 0,05$ ) для 10 белков в моче по частоте встречаемости.

ENOА-HUMAN –  $\alpha$ -енолаза (ген *ENO1*), представляющая собой фермент массой 47 кДа, который выполняет несколько ролей в различных клеточных процессах, включая контроль роста, участие в гликолизе и процессах гипоксической толерантности. У млекопитающих существует 3 изофермента енолазы, включая  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , как правило, обнаруживающиеся в различных тканях, в том числе в почке [21]. Этот белок имеет повышенный уровень экспрессии в повреждённых и регенерирующих клетках во время процесса заживления ран [22]. В почечных канальцах  $\alpha$ -енолаза обнаруживается почти во всех сегментах нефрона, особенно дистальных и собирательных канальцах. В работе W. Chiangjong и V. Thongboonkerd [22] показано, что когда почечный эпителий канальцев подвергается воздействию СОМ-кристаллов (моногидрат оксалата кальция), клетки выделяют большое количество енолазы-1 в базолатеральный отсек. Это, в свою очередь, способствует вторжению кристаллов СОМ и миграции моноцитарных клеток через почечный интерстициум. Впоследствии данный процесс пролонгирует воспалительный ответ, а также способствует образованию камней в почках. Эти данные служат важной основой для дальнейшего выяснения сложных патогенетических механизмов заболевания почек.

KV201-HUMAN – переменная иммуноглобулина каппа 2D-40 (ген *IGKV2D-40*). Молекулы иммуноглобулина человека состоят из двух идентичных тяжёлых цепей, которые определяют классы иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM, IgD и IgE), и одинаковых лёгких цепей (каппа или ламбда), которые ковалентно связаны с тяжёлыми цепями [24]. Циркулирующие в сыворотке крови свободные цепи иммуноглобулинов являются естественным секреторным продуктом В-лимфоцитов и представляют собой уникальный биомаркёр клеточных нарушений, связанных с неопластическими процессами в организме. Увеличение этого показателя свидетельствует об иммунопролиферативных расстройствах или злокачественных заболеваниях. Секретируемые иммуноглобулины опосредуют эффекторную фазу гуморального иммунитета, что приводит к элиминации связанных антигенов [25]. Лёгкие цепи способны проходить через почечный фильтр и поэтому обнаруживаются в моче.

GP2-HUMAN – панкреатический секреторный гранулярный мембранный основной гликопротеин 2-го типа GP2 (ген *GP2*), количественно преобладающий белок мембраны экскреторных гранул ацинарных клеток поджелудочной железы. Синтез GP2, по-видимому, регулируется активированными Т-клетками человека и модулируется ингибиторами TNF. Кишечные эпителиальные клетки, стимулированные GP2, являются мощными хемотаксантами Т-клеток. Кроме того, GP2 оказывает антиапоптотическое и пролиферативное действие на энтероциты, выступая, таким образом, в качестве про-тективного фактора [26].

BGAL-HUMAN –  $\beta$ -галактозидаза (ген *GLB1*), фермент, который часто называют лактазой, катализирует реакцию гидролитического отщепления нередуцированных остатков  $\beta$ -D-галактозы.  $\beta$ -галактозидаза является широко используемым маркёром клеточного старения [27]. При изучении диабетической нефропатии 2-го типа у стареющих пациентов установлено, что экспрессия  $\beta$ -галактозидазы увеличивалась по сравнению с контрольной группой [28]. Нарастание экскреция

Список белков, демонстрирующих статистически значимые различия при сравнении больных Г1 и ГП

Белок	Значение <i>p</i>
ENOА-HUMAN	0,005708122
KV201-HUMAN	0,017941503
GP2-HUMAN	0,01861632
BGAL-HUMAN	0,02458857
K1C27-HUMAN	0,02458857
KI13B-HUMAN	0,02458857
KV113-HUMAN	0,037242543
S10A9-HUMAN	0,037242543
RS27A-HUMAN	0,039351836
GRM1A-HUMAN	0,047624078

$\beta$ -галактозидазы с мочой установлено при введении нефротоксических агентов, неосложненном ПН у женщин репродуктивного возраста [29].

K1C27-HUMAN – кератин I типа цитоскелета 27 (ген *KRT27*) необходим для правильной сборки кератина I и II и образования кератиновых промежуточных волокон. Кератины экспрессируются в эпителиальных клетках и их производных. Они являются самой многочисленной группой промежуточных филаментов и представлены двумя фракциями: кислыми (I тип) и основными (II тип) кератинами. Благодаря ряду экспериментальных работ установлена роль кератинов в регуляции клеточного цикла и роста клеток, развитии апоптоза, миграции кератиноцитов при повреждениях кожи и ремоделировании тканей.

K113B-HUMAN – кинезинподобный белок KIF13B (ген *KIF13B*). Кинезины – суперсемейство моторных белков эукариотических клеток. Кинезины продвигаются по микротрубочкам, используя энергию гидролиза аденозинтрифосфата (АТФ), и являются тубулинзависимыми АТФазами. Кинезины участвуют в осуществлении различных клеточных функций и процессов, включая митоз, мейоз и везикулярный транспорт – транспорт мембранных пузырьков, в том числе быстрый аксональный транспорт [30].

KV113\_HUMAN – иммуноглобулин каппа, переменная 1-13 (ген *IGKV1-13*). Свободные лёгкие цепи каппа ( $\kappa$ ) или ламбда ( $\lambda$ ) (FLC), продуцируемые В-клетками во время синтеза иммуноглобулина, необходимы для корректировки и стимуляции функций полиморфно-ядерных лейкоцитов, дегрануляции тучных клеток, участвующих в воспалительных реакциях. Имея небольшую молекулярную массу, свободные лёгкие цепи иммуноглобулинов играют важную роль в развитии заболеваний почек [31]. Белки стимулируют окислительный стресс в различных клетках и тканях и непосредственно повреждают и клетки уротелия, и кардиомиоциты [32]. Повышение уровня лёгких цепей иммуноглобулинов в плазме и сыворотке выявлено у пациентов с уремией [33]. При хронических заболеваниях почек лёгкие цепи фильтруются через клубочки, а затем реабсорбируются в проксимальных канальцах [34]. В различных исследованиях показано, что повышенные уровни лёгких цепей иммуноглобулинов могут рассматриваться как лучший предиктор риска повреждения почек по сравнению с С-реактивным белком [35]. Лёгкие цепи иммуноглобулинов могут использоваться для скрининга повреждения паренхимы почек при диабете в качестве основного показателя диабетической нефропатии [36].

S10A9\_HUMAN – белок S100A9 (ген *S100A9*). Белок S100A9 представляет собой кальций- и цинксвязывающий белок, играющий заметную роль в регуляции воспалительных процессов и иммунного ответа [37]. Известно, что белок S100A9 активно экспрессируется в цитоплазме нейтрофилов и обнаруживается в высоких концентрациях во внеклеточной жидкости при воспалительных заболеваниях различной природы (хронические воспалительные заболевания кишечника, ревматоидный артрит и др.), чаще всего в комплексе с родственным белком S100A8 (кальпротектин). S100A8 и S100A9 входят в группу эндогенных молекулярных паттернов (danger associated molecular pattern – DAMP), усиливающих врождённый иммунный ответ и играющих важную роль в защите слизистой оболочки от микроорганизмов.

S100A8/A9 является активатором врождённой иммунной системы, увеличивается при различных воспалительных заболеваниях, что достигается посредством активации Toll-подобного рецептора 4 [38].

RS27A\_HUMAN – рибосомальный белок убиквитин-40S S27a (ген *RPS27A*). Убиквитин – это консервативный белок эукариот, который принимает участие в регуляции процессов внутриклеточной деградации множества белков и присутствует практически во всех тканях организма. До 80–90% внутриклеточного распада белков осуществляется убиквитин-протеасомным путем. Убиквитин-протеасомный путь отвечает за регулируемое расщепление многих белков, участвующих в контроле роста и пролиферации клеток, клеточной дифференцировке, иммунных и воспалительных реакциях, апоптозе и метаболической адаптации [39]. Убиквитинирование вовлечено в регуляцию функции почек, участие в высокоорганизованных ответах, при деградации мышечного белка в ответ на потерю функции почек [40]. С-терминальная гидролаза Ubiquitin L1 (UCH-L1) встречается в трубчатых и париетальных клетках почки и экспрессируется *de novo* в повреждённых подоцитах. У UCH-L1-дефицитных мышей развивается протеинурия без существенных изменений морфологии клубочков, но с увеличением тубулоинтерстициального и клубочкового повреждения, приводящего к острой почечной недостаточности и гибели животных. Основной функцией UCH-L1 в почках является регулируемая деградация белка путём контроля числа протеасом.

GRM1A\_HUMAN – GRAM-содержащий белок 1A (ген *GRAMD1A*). GRAM-содержащий белок 1A впервые был обнаружен в эмбриональной стволовой клетке человека, он экспрессируется в тканях эктодермы, мезодермы и эндодермы и многих опухолевых клетках. GRAM-содержащий белок 1A может служить прогностическим фактором при гепатоцеллюлярной карциноме [41].

**Заключение.** Комплект идентифицированных белков мочи у больных ХПН состоял из 661 протеина, протеом больших – из 533 белков. Статистически значимое различие ( $p < 0.05$ ) установлено для 10 белков мочи у больных с обострением ХПН. Среди них  $\alpha$ -енолаза; KV201\_HUMAN – переменная иммуноглобулина каппа 2D-40; панкреатический секреторный гранулярный мембранный основной гликопротеин GP2;  $\beta$ -галактозидаза BGAL; кератин I типа цитоскелета 27; кинезинподобный белок KIF13B; KV113\_HUMAN – иммуноглобулин каппа, переменная 1-13; белок S100A9; рибосомальный убиквитин; GRAM-содержащий белок 1A. Это даёт основание считать, что протеомный анализ можно отнести к методам выявления биомаркёров при заболеваниях почек и мочевыводящих путей. Как известно, вирулентность грамотрицательной флоры, в первую очередь, кишечной палочки и протей, обусловлена их способностью прилипать к эпителию мочевыводящих путей и продвигаться по нему вверх против тока мочи, снижая активность фагоцитоза и выделяя эндотоксин. Следствием данного процесса становится повреждение уротелиальной выстилки и выявление в моче пяти из вышеперечисленных белков, связанных с процессами повреждения и последующей трансформацией метаболических и функциональных свойств клеток уротелия. Альфа-енолаза обнаруживается почти во всех сегментах нефрона, особенно дистальных и собирательных канальцах. GP2\_HUMAN относится к панкреатическим секреторным гранулярным мембранным

основным гликопротеинам. Увеличение экскреции с мочой BGAL\_HUMAN –  $\beta$ -галактозидазы наблюдается при повреждении почечной ткани нефротоксическими агентами. K1C27\_HUMAN – кератин I типа 27 нарастает при ремоделировании тканевых структур. RS27A\_HUMAN – рибосомальный белок убиквитин-40S S27a характеризует степень тубулоинтерстициального и клубочкового повреждения. К участникам воспалительного процесса и нарушения локальной иммунной защиты уротелия канальцев почек могут быть отнесены ещё 5 выделенных белков: переменная иммуноглобулина каппа 2D-40, кинезинподобный белок KIF13B, белок S100A9, иммуноглобулин каппа, переменная 1-13, GRAM-содержащий белок 1A. Данные мочевые белки у больных на высоте воспалительного процесса можно считать биомаркерами имеющихся при ХПН дегенеративных и деструктивных изменений стенок канальцев, происходящих в зоне воспалительной инфильтрации. Эти процессы приводят к попаданию лейкоцитов в интерстиций почечной паренхимы.

Анализ протеома мочи у больных при обострении ПН позволяет выявлять особую группу пептидов, связанную с процессами повреждения эпителиальной выстилки почечных канальцев и формированием локального иммунного ответа. Это потенциальные биомаркеры, которые могут быть полезны в диагностике, мониторинге течения и оценке эффективности терапии при обострении ХПН.

Панель данных маркеров в дальнейшем может быть использована для разработки персонализированных методов лечения пациентов с ХПН, непрерывного мониторинга состояния эпителиальной выстилки почечных канальцев и контроля степени нарушения механизмов иммунной защиты почечной паренхимы.

**Финансирование.** Материалы подготовлены в рамках базовой тематики РАН 65.3.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-9, 11, 17, 19, 20, 22-41 см. REFERENCES)

1. Krochmal M., Fernandes M., Filip S. et al. PeptiCKDb – peptide - and protein-centric database for the investigation of genesis and progression of chronic kidney disease. Database (Oxford). 2016; 2016: baw128.
2. Shen S.J., Hu Z.X., Li Q.H., Wang S.M., Song C.J. et al. Implications of the changes in serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin and cystatin C in patients with chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2014; Mar; 19(3): 129-35.
3. Szeto C.C., Kwan B.C., Lai K.B., Lai F.M., Chow K.M. et al. Urinary expression of kidney injury markers in renal transplant recipients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2010 Dec; 5(12): 2329-37.
4. Thongboonkerd V. Practical points in urinary proteomics. *J. Proteome Res.* 2007; Oct; 6(10): 3881-90.
5. Menglin L., Mindi Z., Youhe G. Changes of proteins induced by anticoagulants, can be more sensitively detected in urine rather than plasma. *Sci. China Life Sci.* 2013; 57(7): 649–56.
6. Li M.Z., Zhao M. Gao Y. Changes of proteins induced by anticoagulants can be more sensitively detected in urine than in plasma. *Science China Life Sciences*. 2014. 57: 649–56.
7. Wu J., Gao Y. Physiological conditions can be reflected in human urine proteome and metabolome. *Expert Review of Proteomics*. 2015.12(6): 623–36.
8. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. *Am. J. Kid. Dis.* 2002; 39 (suppl 1).
9. Schinstock C.A., Semret M.H., Wagner S.J., Borland T.M., Bryant S.C., Kashani K.B. et al. Urinalysis is more specific and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin is more sensitive for early detection of acute kidney injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2013; May; 28(5): 1175-85.
10. Zakharova N.B., Pastushkova L.Kh., Larina I.M., Kashirina J.N., Lyakh, R.V., Popkov V.M. The value of the proteomic composition of the urine in diseases of the urinary tract (review of literature). *Ekspieriment'naya i klinicheskaya urologiya*. 2017; 1: 22-6. (in Russian)
11. Kamijo-Ikemoni A., Ichikawa D., Matsui K., Yokoyama T., Sugaya T., Kimura K. Urinary L-type fatty acid binding protein (L-FABP) as a new urinary biomarker promulgated by the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan. *Rinsho Byori*. 2013 Jul; 61(7): 635-40.
12. Semchenkov A.Yu., Tomilina N.A. “DOQI” refers to the origins of chronic renal failure (On a new tab of the recommendations of K/DOQI for the diagnosis, classification and assessment of severity of chronic kidney disease). *Nefrologiya i dializ*. 2004; 6(3): 204-20. (in Russian)
13. Dobronravov V.A. Overview of the pathophysiology of acute kidney injury [Обзор патофизиологии острого повреждения почек]. In: Smirnov A.V., Dobronravov V.A., Rumyantsev A.Sh., Kayukov I.G. *Acute kidney injury [Ostroie povrezhdenie pochek]*. Moscow: MIA; 2015; 30-79. (in Russian)
14. Valeeva O.A., Pastushkova L.Kh., Pakhorukov N.A. Dobrokhotov V.I., Larina I.M. Heart rate Variability in the proteome of urine of a healthy person in the experiment with 105-day isolation in a pressurized. *Fiziologiya cheloveka*. 2011; 37(3): 98 - 102. (in Russian)
15. Kangari G., Esteghamati M., Ghasemi K., Mahboobi H. Predictive accuracy of urinary  $\beta$ 2-microglobulin for kidney injury in children with acute pyelonephritis. *Iran J. Kidney Dis.* 2015; Jan; 9(1):19-24.
16. Shatokhina C.N., Dasaev L.A., Shatokhina I.S., Shabalin V.N., Shilov E.M. the Pathogenetic features of the morphological picture of the facies of the urine of patients with chronic pyelonephritis. *Lechaschij Vrach*. 2014; (1): 36-42. (in Russian)
17. Fidan K., Kandur Y., Buyukkaragoz B., Akdemir U.O., Soylemezoglu O. Hypertension in pediatric patients with renal scarring in association with vesicoureteral reflux. *Urology*. 2013; Jan; 81(1): 173-7.
18. Kim A.J., Ro H., Kim H., Chang J.H., Lee H.H., Chung W. et al. Klotho and S100A8/A9 as Discriminative Markers between Pre-Renal and Intrinsic Acute Kidney Injury. *PLoS One*. 2016; Jan 22; 11(1): e0147255.
10. Захарова Н.Б., Пастушкова Л.Х., Ларина И.М., Каширина Д.Н., Лях Р.В., Попков В.М. Значение протеомного состава мочи при заболеваниях мочевыводящих путей (обзор литературы). *Экспериментальная и клиническая урология*. 2017; 1: 22-6.
12. Земченков А.Ю., Томила Н.А. «К/ДОКИ» обращается к истокам хронической почечной недостаточности (О новом разделе Рекомендаций К/ДОQI по диагностике, классификации и оценке тяжести хронических заболеваний почек). *Нефрология и диализ*. 2004; 6(3): 204-20.
13. Добронравов В.А. Обзор патофизиологии острого повреждения почек. В кн.: Смирнов А.В., Добронравов В.А, Румянцев А.Ш., Каюков И.Г. Острое повреждение почек. М.: МИА; 2015; 30-79.
14. 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): 98 - 102.
16. Шатохина С.Н., Дасаева Л.А., Шатохина И.С., Шабалин В.Н., Шилов Е.М. Патогенетические особенности морфологической картины фаций мочи больных хроническим пиелонефритом. *Лечащий врач*. 2014; (1): 36-42.
19. Смирнов А.В., Добронравов В.А., Румянцев А.Ш., Шилов Е.М., Вагазин А.В. и др. Национальные рекомендации. Острое повреждение почек: основные принципы диагностики, профилактики и терапии. Часть 1. *Нефрология*. 2016; 20(1):79-104.

19. Smirnov A.V., Dobronravov V.A., Rumjancev A.Sh., Shilov E.M., Vatazin A.V. et al. National recommendations. Sharp injury of kidneys: basic principles of diagnostics, prevention and therapy. Part 1. *Nefrologiya*. 2016; 20(1):79-104. (in Russian)
20. Kang H.J., Jung S.K., Kim S.J., Chung S.J. Structure of human alpha-enolase (hENO1), a multifunctional glycolytic enzyme. *Acta Crystallogr. D. Crystallogr.* 2008; Jun; 64(Pt 6): 651-7.
21. Eltoweissy M., Müller G.A., Bibi A., Nguye P.V., Dihazi G.H., Müller C.A. et al. Proteomics analysis identifies PARK7 as an important player for renal cell resistance and survival under oxidative stress. *Mol. Biosyst.* 2011 Apr; 7(4): 1277-88.
22. Chiangjong W., Thongboonkerd V. Calcium oxalate crystals increased enolase-1 secretion from renal tubular cells that subsequently enhanced crystal and monocyte invasion through renal interstitium. *Sci Rep.* 2016; 6: 24064.
23. Schroeder H.W. Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; Feb; 125(2 Suppl 2): 41-52.
24. Wang N.S., McHeyzer-Williams L.J., Okitsu S.L., Burris T.P., Reiner S.L., McHeyzer-Williams M.G. Divergent transcriptional programming of class-specific B cell memory by T-bet and ROR $\alpha$ . *Nat. Immunol.* 2012; May 6; 13(6): 604-11.
25. Uchil P.D., Nagarajan A., Kumar P.  $\beta$ -Galactosidase. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2017; Oct 3; 2017(10): pdb.top096198.
26. Verzola D., Gandolfo M.T., Gaetani G., Ferraris A., Mangerini R., Ferrario F. et al. Garibotto Accelerated senescence in the kidneys of patients with type 2 diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2008; Nov; 295(5): 1563-73.
27. Hamed S.A. The effect of antiepileptic drugs on the kidney function and structure. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 2017; Sep; 10(9): 993-1006.
28. Ossipova O., Chu C.W., Fillatre J., Brott B.K., Itoh K., Sokol S.Y. The involvement of PCP proteins in radial cell intercalations during *Xenopus* embryonic development. *Dev. Biol.* 2015; Dec 15; 408(2): 316-27.
29. Esparvarinha M., Nickho H., Mohammadi H., Aghebati-Maleki L., Abdolalizadeh J., Majidi J. The role of free kappa and lambda light chains in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Biomed Pharmacother.* 2017; Jul; 91: 632-44.
30. Anderson G.P. Free immunoglobulin light chains in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185(8): 793-5.
31. Cohen G., Rudnicki M., Hörl W.H. Uremic toxins modulate the spontaneous apoptotic cell death and essential functions of neutrophils. *Kidney Int.* 2001; 59: 48-S52.
32. Hutchison C.A., Harding S., Hewins P., Mead G.P., Townsend J., Bradwell A.R. et al. Quantitative assessment of serum and urinary polyclonal free light chains in patients with chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 3(6): 1684-90.
33. Desjardins L., Liabeuf S., Lenglet A., Lemke H.-D., Vanholder R., Choukroun G. et al. E.U.T.W. Group. Association between free light chain levels, and disease progression and mortality in chronic kidney disease. *Toxins.* 2013; 5(11): 2058-73.
34. Jia J., Arif A., Terenzi F., Willard B., Plow E.F., Hazen S.L. et al. Target-selective protein S-nitrosylation by sequence motif recognition. *Cell.* 2014; 159: 623-34.
35. Frosch M., Metz D., Foell T., Sorg C., Sunderkötter C., Roth J. Early activation of cutaneous vessels and epithelial cells is characteristic of acute systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Exp. Dermatol.* 2005; 14(4): 259-65.
36. Champai boon C., Sappington K.J., Guenther B.D., Ross K.F., Herzberg M.C. Calprotectin S100A9 calciumbinding loops I and II are essential for keratinocyte resistance to bacterial invasion. *J. Biol. Chem.* 2009 Mar 3; 284(11): 7078-90.
37. Vogl T., Tenbrock K., Ludwig S., Leukert N., Ehrhardt C., van Zoelen M.A. et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat. Med.* 2007; Sep; 13(9): 1042-9.
38. Turnbull A.P., Ioannidis S., Krajewski W.W., Pinto-Fernandez A., Heride C., Martin A.C.L. et al. Molecular basis of USP7 inhibition by selective small-molecule inhibitors. *Nature.* 2017; Oct 26; 550(7677): 481-6.
39. Belgareh-Touzé N., Léon S., Erpapazoglou Z., Stawiecka-Mirota M., Urban-Grimal D., Haguenaer-Tsapis R. Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. *Biochem. Soc. Trans.* 2008; Oct; 36(Pt 5): 791-6.
40. Rajan V., Mitch W. E. Ubiquitin, proteasomes and proteolytic mechanisms activated by kidney disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2008; Dec.; 1782(12): 795-9.
41. Song X., Wang S., Gu B., Hou Q., Liu Y., Zhang M. Production and characterization of a monoclonal antibody against GRAM domain-containing protein 1A. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* 2014; Aug; 33(4): 246-53.

Поступила 25.01.18  
Принята к печати 15.03.18