

20. Shmerling R.H. Synovial fluid analysis: a critical reappraisal. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 1994; 20: 503.
21. Swan A., Amer H., Dieppe P. The value of synovial fluid assays in the diagnosis of joint disease: a literature survey. *Ann. Rheum. Dis.* 2002; 61: 493—8.
22. Lenskia M., Scherera M.A. Analysis of synovial inflammatory markers to differ infectious from gouty arthritis. *Clin. Biochem.* 2014; 47(1—2): 49—55.
23. Pascual E., Tovar J., Ruiz M.T. The ordinary light microscope: an appropriate tool for provisional detection and identification of crystals in synovial fluid. *Ann. Rheum. Dis.* 1989; 48(12): 983—5.
24. Lumbreras B., Pascual E., Frassetto J., González-Salinas J., Rodríguez E., Hernández-Aguado I. Analysis for crystals in synovial fluid: training of the analysts results in high consistency. *Ann. Rheum. Dis.* 2005; 64(4): 612—5.
25. Dieppe P., Swan A. Identification of crystals in synovial fluid. *Ann. Rheum. Dis.* 1999; 58: 261—3.
26. Ivorra J., Rosas J., Pascual E. Most calcium pyrophosphate crystals appear as non-birefringent. *Ann. Rheum. Dis.* 1999; 58: 582—4.
27. Gordon C., Swan A., Dieppe P. Detection of crystals in synovial fluid crystal by light microscopy: sensitivity and reliability. *Ann. Rheum. Dis.* 1989; 48: 737—42.
28. Swan A.J., Chapman B., Heap P., Seward H., Dieppe P. Submicroscopic crystals in osteoarthritic synovial fluids. *Ann. Rheum. Dis.* 1994; 53(7): 467—70.
29. Pascual E., Jovani V.A. Quantitative study of the phagocytosis of urate crystals in the SF of asymptomatic joints of patients with gout. *Br. J. Rheumatol.* 1995; 34(8): 724—6.
30. Martinez-Sanchis A., Pascual E. Intracellular and extracellular CPPD crystals are a regular feature in synovial fluid from uninfamed joints of patients with CPPD related arthropathy. *Ann. Rheum. Dis.* 2005; 64: 1769—72.
31. Yu K.H., Luo S.F., Liou L.B., Wu Y.J., Tsai W.P., Chen J.Y. et al. Concomitant septic and gouty arthritis — an analysis of 30 cases. *Rheumatology (Oxford)*. 2003; 42(9): 1062—6.
32. Wang C., Zhong D., Liao Q., Kong L., Liu A., Xiao H. Procalcitonin levels in fresh serum and fresh synovial fluid for the differential diagnosis of knee septic arthritis from rheumatoid arthritis, osteoarthritis and gouty arthritis. *Exp. Ther. Med.* 2014; 8(4): 1075—80.
33. Lenski M., Scherer M.A. Analysis of synovial inflammatory markers to differ infectious from gouty arthritis. *Clin. Biochem.* 2014; 47(1—2): 49—55.

Поступила 26.02.16  
Received 26.02.16

© БОРМОТОВА Е.А., ГУПАЛОВА Т.В., 2016

УДК 616.633.962.3-074

Бормотова Е.А., Гупалова Т.В.

## ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОАЛЬБУМИУРИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВОГО РЕКОМБИНАНТНОГО АЛЬБУМИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ПОЛИПЕПТИДА

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Наиболее значимыми патологиями, обуславливающими нарушение экскреции белка с мочой, являются СД и АГ — именно эти заболевания наиболее опасны для почек. Поэтому важное значение имеет поиск ранних признаков поражения почек у больных этими заболеваниями. Одним из ранних признаков поражения почек у больных СД и АГ является микроальбуминурия. Только эта ранняя (доклиническая) стадия поражения почек является единственной обратимой при своевременном назначении медикаментозной терапии. Практически все применяемые в настоящее время диагностические тест-системы для выявления микроальбуминурии основаны на иммунологическом полуколичественном и количественном определении концентрации ЧСА в моче. В настоящей работе использован новый рекомбинантный ЧСА-связывающий полипептид А3 из штамма стрептококка группы G, выделенного из коровьего молока. Изучена ЧСА-связывающая способность полипептида А3 в сравнении с таковой у полипептида А2. Рекомбинантный ЧСА-связывающий полипептид А2 ранее был впервые применен в тест-системе для выявления микроальбуминурии вместо обычно используемых антител. Изучение ЧСА-связывающей способности рекомбинантных полипептидов А3 и А2 показало, что оба они способны вступать во взаимодействие с ЧСА как в растворе, так и в адсорбированном состоянии. Это свойство позволило использовать полипептид А3 в иммобилизованном виде в количественной тест-системе для определения микроальбуминурии. В настоящей работе также предлагается специфический и чувствительный метод скрининга и мониторинга больных СД и АГ, в котором был использован меченый ЧСА-связывающий полипептид А3 в сочетании с технологией микрочипа. В результате сравнения тест-систем с использованием рекомбинантных полипептидов А2 и А3 было выявлено, что использование в тест-системе полипептида А3 позволяет более точно определить концентрацию ЧСА в пробах мочи. Такая тест-система успешно применена как для выявления, так и для количественного определения микроальбуминурии у больных СД и АГ.

Ключевые слова: микроальбуминурия; рекомбинантный полипептид; ЧСА-связывающая способность; микрочип.

Для цитирования: Бормотова Е.А., Гупалова Т.В. Тест-система для определения микроальбуминурии с использованием нового рекомбинантного альбумин-связывающего полипептида. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(8): 484-489. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-484-489

Bormotova E.A., Gupalova T.V.

THE TEST-SYSTEM FOR DETECTION OF MICROALBUMINURIA USING THE NEW RECOMBINANT ALBUMIN-BOUNDED POLY-PEPTIDE

The institute of experimental medicine, 197376 St. Petersburg, Russia

Для корреспонденции: Гупалова Татьяна Виталиевна, д-р биологических наук, в.вед. сотр. отд. молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ», e-mail: tvgupalova@rambler.ru

The diabetes mellitus and arterial hypertension are among the most significant pathologies conditioning disorder of excretion of protein with urine. These very diseases are mostly dangerous for kidneys. Therefore, important significance has the search of early manifestations of damage of kidneys in patients with these diseases. The microalbuminuria is one of early manifestations of affection of kidneys in patients with diabetes mellitus and arterial hypertension. Only this early (pre-clinical) stage of affection of kidneys is the only reversible one in case of prescription of medicinal therapy. Nowadays, factually all applied diagnostic test-systems for detection of microalbuminuria are based on immunological half-quantitative and quantitative detection of concentration of human serum albumin in urine. In this study was applied new recombinant human serum poly-peptide A3 from strain of streptococcus group G isolated from cow milk. The human serum albumin-binding capacity of poly-peptide A3 was analyzed in comparison with poly-peptide A2. Previously, recombinant human serum albumin-binding poly-peptide A2 was primarily applied in test-system for detection of microalbuminuria instead of commonly used antibodies.

The analysis of human serum albumin-binding capacity of recombinant human serum poly-peptide A3 and A2 demonstrated that both of them can interact with human serum albumin in solution and adsorbed condition. This characteristic permitted applying poly-peptide A3 in immobilized form in qualitative test-system for detecting microalbuminuria. The actual study also propose specific and sensitive technique of screening and monitoring of patients with diabetes mellitus and arterial hypertension. The mentioned technique used tagged human serum albumin-binding polypeptide A3 combined with microchip technology. The comparison of test-systems using recombinant poly-peptides A3 and A2 established that application of poly-peptide A3 in test-system permits to detect more precisely concentration of human serum albumin in urine samples. The test-system of this kind was successfully implemented for both detection and qualitative identification of microalbuminuria in patients with diabetes mellitus and arterial hypertension.

**Key words:** microalbuminuria; recombinant poly-peptide; human serum albumin-binding capacity; microchip.

**For citation:** Bormotova E.A., Gupalova T.V. The test-system for detection of microalbuminuria using the new recombinant albumin-bounded poly-peptide. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (8): 484-489 (in Russ.)*

**DOI:** 10.18821/0869-2084-2016-61-8-484-489

**For correspondence:** Gupalova T.V., doctor of biological sciences, leading researcher of department of molecular microbiology. e-mail: tvgupalova@rambler.ru

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Financing.** The study had no sponsor support.

Received 15.03.2016  
Accepted 30.03.2016

**Введение.** В последние годы во всем мире неуклонно растет смертность от заболеваний, приводящих к хронической почечной недостаточности (ХПН). Наиболее частыми причинами возникновения почечной недостаточности являются сахарный диабет (СД) и эссенциальная гипертензия (АГ). Из-за значительной распространенности СД и АГ важное значение имеет поиск ранних признаков поражения почек у больных с указанной патологией [1].

Одним из наиболее ранних признаков поражения почек у больных СД является микроальбуминурия. Под термином «микроальбуминурия» понимают экскрецию альбумина с мочой в достаточно низких концентрациях — от 30 до 300 мг/сут. Такое количество белка не может быть выявлено методами традиционного рутинного исследования мочи, в связи с чем ранняя (доклиническая) стадия поражения почек может быть не диагностирована и не замечена. Однако, поскольку эта стадия является единственной обратимой при своевременном назначении патогенетической медикаментозной терапии, ее выявление является обязательным условием успешной борьбы с диабетической нефропатией (ДН) и ХПН при диабете обоих типов [2].

Кроме того, микроальбуминурия является важнейшим ранним (доклиническим) признаком поражения почек, отражающим начальные стадии патологии сосудов, и неизменно коррелирует с увеличением сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности [3, 4]. Как показывают клинические исследования, даже самые небольшие уровни повышения экскреции альбумина с мочой четко ассоциируются со значительным возрастанием риска кардиоваскулярных событий, в том числе фатальных, а прогрессирующее со временем увеличение уровня микроальбуминурии однозначно указывает на ухудшение состояния сосудов и, соответственно, обуславливает дополнительное повышение риска.

Для количественного определения уровня экскреции альбуминов с мочой используют иммуноферментные и иммуно-

турбидиметрические методы, основанные на взаимодействии «антиген—антитело» [2, 5]. Однако специфичность антител относительна, они могут взаимодействовать с рядом других антигенов и давать так называемую «неспецифическую» реакцию.

В последние десятилетия выявлены и изучены белки бактерий, обладающие рецепторной активностью в отношении человеческого сывороточного альбумина (ЧСА). Стрептококки (*Streptococcus*) групп А, С и G экспрессируют поверхностные белки, которые связывают ЧСА [6, 7]. Взаимодействие поверхностных белков стрептококков с молекулой ЧСА происходит за счет части аминокислотной последовательности, названной GA-модулем (GA-related albumin-binding domain) [8].

Среди таких поверхностных белков стрептококков группы G (СГГ) интерес представляет белок G, ЧСА-связывающая часть которого имеет три гомологичные повторяющиеся последовательности, т. е. три GA-модуля [9]. Из одного штамма *Peptostreptococcus magnus* выделен PAB-белок, связывающий ЧСА [10]. Этот белок имеет один GA-модуль, гомологичный ЧСА-связывающей области белка G [11, 12, 13]. Из штамма *Streptococcus canis* DG 12, выделенного из коровьего молока, получен ЧСА-связывающий белок, который содержит два GA-модуля. Он не связывает IgG, но по способности связывать ЧСА превосходит белок G [14]. Это свойство делает его привлекательным для практического применения.

Изучение структуры ЧСА-связывающих белков имеет большое значение для создания белковых реагентов, актуальных в иммунохимии, протеомике, биотехнологии и клинической диагностике.

Использование рекомбинантного полипептида в тест-системах позволяет: отказаться от трудоемкого процесса приготовления специфических антител к ЧСА (при котором используются лабораторные животные); избежать неспецифических «фоновых» реакций, часто встречающихся в имму-

нологии; стандартизовать используемый ЧСА-связывающий полипептид — и таким образом стабилизировать всю систему анализа.

Рекомбинантный полипептид, обозначенный как А2, был получен из штамма DG 13 CGG, выделенного из коровьего молока, который использовали для создания тест-системы для определения микроальбуминурии, основанной на взаимодействии «белок—белок» с использованием рекомбинантного полипептида, качество очистки которого обеспечивает практически 100% специфичность [15]. Впервые в количественной тест-системе для определения микроальбуминурии применен рекомбинантный ЧСА-связывающий белок стрептококка вместо обычно используемых антител. Он характеризуется последовательностью из 346 аминокислот [15].

Кроме ЧСА-связывающей области, состоящей из двух GA-модулей, его последовательность, содержит несколько других областей, за счет которых увеличена молекулярная масса полипептида А2, составляющая 48 кДа [15, 16]. Стеерические затруднения при взаимодействии ЧСА с молекулой большого размера вызвали отсутствие оптимальной конформации.

В результате клонирования фрагмента гена, кодирующего полипептид, содержащий только два GA-модуля, был получен новый рекомбинантный полипептид А3 [16]. Последовательность этого полипептида состоит из 124 аминокислот, а его молекулярная масса — 14 кДа.

Целью данной работы явилось изучение возможности применения полипептида А3 для создания чувствительной и высокоспецифической диагностической тест-системы для выявления и количественного определения микроальбуминурии как диагностического критерия начальной стадии развития нефропатии.

**Методы исследования.** В работе использовались рекомбинантные полипептиды А2 и А3, которые получены, как описано ранее [16], субстрат 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine dihydrochloride (ТМВ, Sigma, США) в таблетках по 1 мг для определения активности пероксидазы хрена в тест-системе, готовый жидкий субстрат для мембран 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine dihydrochloride (ТМВ, Sigma, США), обезжиренное сухое молоко (Nonfat dry milk, Bio-Rad, США). Пробы мочи пациентов предоставлены 38-й больницей им. Семашко, г. Пушкин.

**Изучение взаимодействия рекомбинантных полипептидов с ЧСА.** Способность рекомбинантных полипептидов А2 и А3 связывать ЧСА изучали методами ИФА. Для ИФА использовались планшеты NUNC MaxiSorp (Дания).

**Прямой метод.** Иммунизацию каждого полипептида в концентрации 1 мкг/мл, разведенного в 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 0,85% NaCl (ФСБ), проводили в течение 18 ч при 4°C. В контрольные лунки вместо раствора полипептида вносили раствор ФСБ. Не связавшийся полипептид отмывали три раза, добавляя по 150 мкл ФСБ с 0,05% твин-20 (ФСБТ) в каждую лунку. Во все лунки вносили двукратные разведения ЧСА, меченного пероксидазой, и инкубировали их 1 ч. Конъюгирование пероксидазы хрена с ЧСА проводили периодатным методом [17]. Избыток ЧСА удаляли трехкратным отмыванием раствором ФСБТ. Активность пероксидазы хрена определяли с помощью субстрата, состоящего из ТМВ для тест-системы ИФА, 0,1 М фосфатно-цитратного буфера, рН 5,0, и 0,0065% перекиси водорода. Реакцию останавливали добавлением 2N серной кислоты. Оптическую плотность определяли на мультискане при длине волны 450 нм.

**Непрямой метод.** В случае непрямого ИФА на твердой фазе адсорбировали немеченый ЧСА, к которому из раствора присоединялись молекулы А2 или А3, в свою очередь связывающие из раствора меченый пероксидазой ЧСА.

Приготовление разведенных препаратов меченого ЧСА осуществляли с применением раствора ФСБ. В этом случае сенсibilizировали ЧСА, разведенный в ФСБ, в течение 18 ч при 4°C. Не связавшийся ЧСА отмывали три раза добавлением по 150 мкл ФСБТ в каждую лунку и добавляли двукратные разведения рекомбинантного полипептида, начиная с 20 мкг/мл, инкубировали 1 час при 37°C и вновь три раза отмывали ФСБТ. Полипептид, связавшийся с ЧСА, определяли с помощью конъюгата ЧСА с пероксидазой. Результаты регистрировали так же, как и при прямом методе.

**Тест-система для определения микроальбуминурии.** Для создания количественной тест-системы был выбран конкурентный метод ИФА, так как он предусматривает минимальное число операций, требует незначительного расхода реагентов и легко может быть автоматизирован.

Количественное определение микроальбуминурии проводили следующим образом: на твердую поверхность полистиролового планшета иммобилизовали полипептид А2 или А3, на который наносили анализируемые пробы мочи и стандартные пробы ЧСА (5; 10; 20; 25; 50, 100 и 200 мкг/мл) одновременно с меченым ЧСА. При такой постановке ЧСА пробы и меченый ЧСА конкурируют за ЧСА-связывающий полипептид, иммобилизованный на твердой фазе. Концентрация ЧСА в анализируемой пробе обратно пропорциональна ферментативной активности твердой фазы. Строили калибровочную кривую зависимости оптической плотности от концентрации ЧСА в стандартных пробах. Концентрацию ЧСА в пробах мочи находили по значениям оптической плотности на калибровочной кривой.

**Технология микрочипа для выявления микроальбуминурии.** В качестве матрицы для нанесения проб мочи пациентов с нефропатией была выбрана нитроцеллюлозная мембрана. На нитроцеллюлозную мембрану размером 1 см<sup>2</sup> были нанесены пробы мочи с помощью автоматического принтера для микропечати BioOdyssey Calligrapher miniarrayer (Bio-Rad, США), который является настольным роботизированным принтером, предназначенным для печати или нанесения ДНК, белков или других биологических материалов на предметные стекла, мембраны или в 96-луночные планшеты. Первые 6 проб на мембране соответствовали разведениям стандартного препарата ЧСА для построения калибровочной кривой (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 мкг/мл), последующие соответствовали исследуемым образцам мочи. Мембрана была проинкубирована в блокирующем растворе (2% сухое молоко, разведенное в ФСБ с ЧСА-связывающим полипептидом А3, меченным пероксидазой) в течение 5 мин. Конъюгирование пероксидазы хрена с полипептидом А3 проводили периодатным методом [17]. Затем мембрану промывали блокирующим раствором и раствором ФСБ, высушивали и окрашивали раствором ТМВ.

Стандартное отклонение по выборке оценивали, используя программу Microsoft Excel 2013.

**Результаты. Изучение взаимодействия рекомбинантного полипептида А3 с ЧСА при сравнении с аналогичной реакцией для полипептида А2.** Проведено сопоставление рецепторной активности рекомбинантных полипептидов А2 и А3 в отношении ЧСА, представленного следующими образцами: 1) поликлональный ЧСА, меченный пероксидазой хрена; 2) поликлональный немеченый ЧСА.

Установлено, что полипептид А3, так же как и полипептид А2, обладает способностью к селективному связыванию с ЧСА в использованных вариантах постановки ИФА. В случае прямого ИФА полипептиды А2 и А3 были иммобилизованы на твердой фазе, при этом оценивалось количество связавшегося с ними меченого ЧСА. На рис. 1 показана гистограмма, отражающая сопоставление ЧСА-

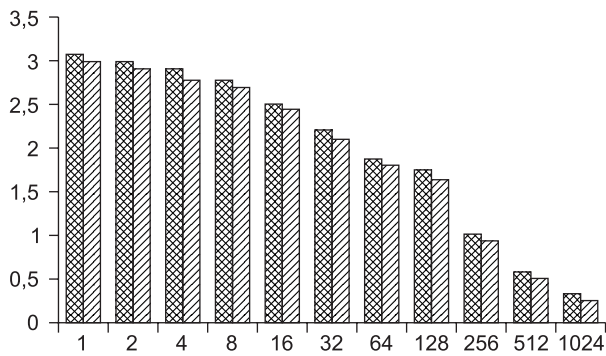


Рис. 1. Сравнение эффективности связывания полипептидов А2 и А3 с ЧСА: темный столбик — полипептид А2; светлый столбик — полипептид А3. По оси абсцисс — разведения меченого ЧСА, тыс. раз, по оси ординат — ОД 450 нм.

связывающей активности полипептидов А2 и А3. Исследуемые полипептиды А2 и А3 обладают ЧСА-связывающей активностью в отношении меченого ЧСА, причем количество ЧСА, связанного полипептидом А3, примерно такое же, что и в случае полипептида А2. Полипептиды А2 и А3, кодируемые различными фрагментами гена и имеющие разную молекулярную массу, несомненно имеют структурные различия, определяющие ЧСА-рецепторную активность каждого из них. Можно допустить, что на реализацию этой способности влияют и условия постановки ИФА, а именно — нахождение полипептида на твердой фазе или в растворе. Влияние этого фактора объясняется наличием у пептидов пространственной конфигурации, которая неодинакова для молекул, свободно циркулирующих в растворе или фиксированных на твердой фазе. Для проверки этого предположения использовали непрямой ИФА.

При постановке непрямого ИФА результаты показали, что полипептиды в растворе связывают ЧСА примерно с одинаковой активностью (рис. 2). Полипептиды А2 и А3 способны вступать во взаимодействие с ЧСА как в растворе (непрямой ИФА), так и в адсорбированном состоянии (прямой ИФА). Это свойство позволяет использовать их в качестве иммунохимических реагентов в ИФА, причем как в иммобилизованном виде, так и в роли выявляющих молекул при наличии ферментной метки. При этом степень связывания у полипептидов А2 и А3 в условиях прямого и непрямого ИФА примерно одинаковая.

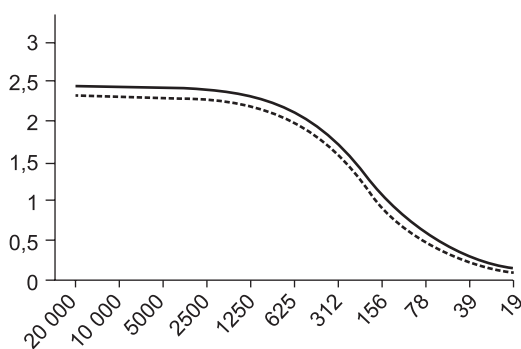


Рис. 2. Сравнение эффективности связывания в растворе полипептидов А2 и А3 с ЧСА: сплошная линия — полипептид А2, пунктирная линия — полипептид А3. По оси абсцисс — концентрация полипептидов, нг/мл, по оси ординат — ОД 450 нм.

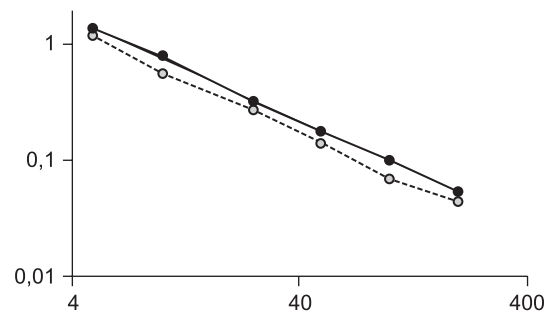


Рис. 3. Стандартные кривые зависимости оптической плотности от концентрации ЧСА для полипептидов А2 и А3: сплошная линия — для полипептида А3, пунктирная линия — для полипептида А2. По оси абсцисс — концентрация альбумина, мкг/мл, по оси ординат — ОД 450 нм.

**Использование полипептида А3 в тест-системе для определения микроальбуминурии.** При разработке тест-системы, описанной выше, были подобраны условия анализа, обеспечивающие необходимую чувствительность и специфичность. На твердую поверхность планшета иммобилизовался рекомбинантный ЧСА-связывающий полипептид (А2 или А3), на который наносили анализируемые пробы мочи одновременно с меченым ЧСА. Рабочее разведение меченого ЧСА составило 1:8000, концентрация иммобилизованного полипептида — 0,5 мкг/мл. После подбора оптимальных условий строили калибровочную кривую зависимости оптической плотности от концентрации ЧСА в стандартных пробах (5; 10; 20; 25; 50, 100 и 200 мкг/мл). Концентрацию ЧСА в моче определяли по значениям оптической плотности на калибровочной кривой.

При многократных повторениях данного эксперимента было выявлено, что при использовании полипептида А3 с двумя ГА-модулями точки точно ложатся на прямую и точно определяется концентрация ЧСА в пробах мочи. Что касается использования полипептида А2, обладающего большим молекулярным весом и охватывающего большую область, чем ЧСА-связывающие ГА-модули, точки, соответствующие калибровочным пробам, не всегда ложились на прямую, что затрудняло точное определение концентрации альбумина в моче (рис. 3).

Таким образом, удалось показать, что рекомбинантный полипептид А3 может быть использован в качестве высокоспецифичного реагента для количественного определения ЧСА в моче. Минимальная концентрация ЧСА, которую можно определить в моче, составила 5 мкг/мл, а максимальная — 200 мкг/мл. Мочу с большей концентрацией ЧСА следует разводить раствором ФСБ. В результате чувствительность такого способа определения позволяет выявлять количество ЧСА в моче в пределах, включающих экскрецию альбумина с мочой в норме, т. е. до 20 мкг/мл, и в пределах микроальбуминурии от 20 до 200 мкг/мл.

При скрининге и мониторинге больных СД и АГ для выявления микроальбуминурии необходимо проводить одновременный анализ нескольких десятков образцов мочи. В данной работе был использован меченный пероксидазой рекомбинантный ЧСА-связывающий полипептид А3 в сочетании с микрочиповой технологией.

Метод быстрого выявления микроальбуминурии и количественная тест-система для определения микроальбуминурии, в которой на твердую поверхность планшета наносили рекомбинантный полипептид А3, были апробированы на клинических пробах мочи больных СД. Данные представлены на рис. 4 и в таблице.

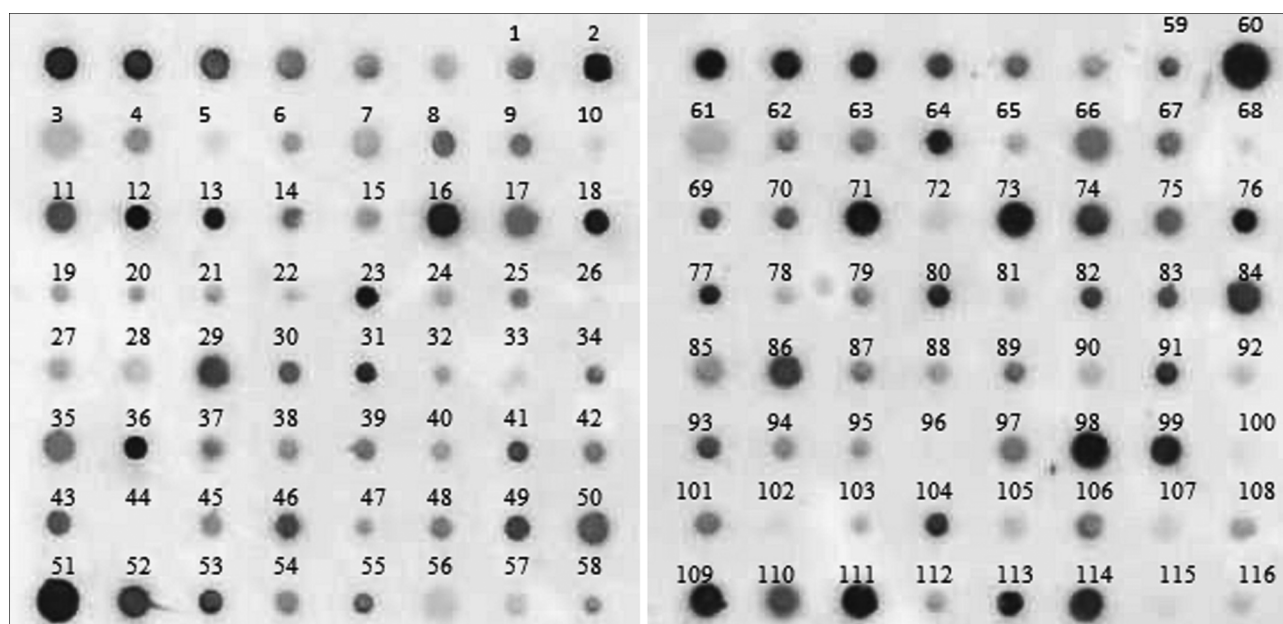


Рис. 4. Микрочип для скрининга и мониторинга микроальбуминурии. Первые шесть проб — разведения стандартного препарата ЧСА, остальные — пробы мочи пациентов под соответствующими номерами. Окраска производилась раствором ТМВ. Изображение увеличено в 8 раз.

Как следует из рис. 4, на микрочипе в пробах мочи под номерами 2, 16, 51, 60, 98, 111 и 114 выявляется макроальбуминурия, а в пробах 12, 13, 18, 23, 29, 31, 36, 52, 53, 64, 71, 74, 76, 77, 80, 82, 84, 86, 91, 99, 109 и 113 — микроальбуминурия. Концентрация ЧСА в остальных пробах мочи соответствует норме. Исходя из этих предварительных результатов, пробы мочи с обнаруженными микро- и макроальбуминурией были проанализированы в количественной тест-системе. Пробы мочи с выявленной макроальбуминурией были разведены раствором ФСБ.

Количественные данные, приведенные в таблице, подтвердили наличие макроальбуминурии в пробах мочи 16, 51, 60, 98, 111 и 114, что соответствовало данным клинического анализа, выполненного на автоматическом анализаторе мочи CombiScan 500. В 22 пробах мочи пациентов количественно подтверждена микроальбуминурия, выявленная на микрочипе, что не было определено методом, используемым в кли-

нике. Эти пробы мочи были проанализированы на микроальбуминурию в той же тест-системе, но с использованием полипептида А2. В этом случае определить достоверную концентрацию ЧСА в моче в некоторых пробах было трудно, так как не все точки, соответствующие различным значениям концентрации стандартных проб ЧСА, ложились на калибровочную кривую (см. рис. 3).

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что тест-система с использованием рекомбинантного полипептида А3 может быть успешно применена для выявления ранних стадий ДН и других форм патологии, при которых микроальбуминурия является важным прогностическим критерием.

**Обсуждение.** Задача настоящей работы состояла в изучении возможности использования рекомбинантного полипептида А3 в тест-системе для количественного определения микроальбуминурии у пациентов с СД и АГ и для выявления начальной стадии нефропатии при проведении скрининга и мониторинга проб мочи таких пациентов. Тест-система, в которой вместо антител использован рекомбинантный белок, описана в работе [15]. Впервые в предлагаемой тест-системе по определению микроальбуминурии был использован рекомбинантный полипептид, связывающий человеческий сывороточный ЧСА с высокой специфичностью и чувствительностью. Определение уровня экскреции альбуминов с мочой, основанного на взаимодействии «белок—белок» с использованием рекомбинантного полипептида, позволяет избежать неспецифических «фоновых» реакций, часто встречающихся в иммунологии, стандартизировать используемый ЧСА-связывающий полипептид и таким образом стабилизировать всю систему анализа. Однако в этой тест-системе использован рекомбинантный полипептид А2, имеющий большую молекулярную массу и охватывающий большую ЧСА-связывающую область, чем область с двумя GA-модулями. Это сказалось на графике, при построении которого точки, соответствующие калибровочным пробам, не всегда ложились на прямую, что затрудняло точное определение концентрации ЧСА в моче. В тест-системе с использованием полипептида А3, охватывающего

#### Определение концентрации ЧСА в моче у больных СД

Микроальбуминурия				Макроальбуминурия	
№ пробы	ЧСА, мкг/мл	№ пробы	ЧСА, мкг/мл	№ пробы	ЧСА, мкг/мл
12	68,2 ± 1,3	74	70,2 ± 1,4	2	239,4 ± 2,5
13	34,2 ± 1,1	76	39,8 ± 1,8	16	400,2 ± 2,3
18	60,0 ± 1,2	77	29,8 ± 1,3	51	800,4 ± 3,2
23	49,8 ± 1,8	80	30,2 ± 1,9	60	399,4 ± 2,4
29	20,6 ± 2,1	82	21,4 ± 1,2	98	400,4 ± 2,5
31	30,6 ± 1,1	84	79,8 ± 1,5	111	320,6 ± 2,4
36	40,6 ± 1,2	86	21,0 ± 1,1	114	219,8 ± 1,6
52	84,4 ± 1,5	91	29,8 ± 1,2		
53	24,8 ± 1,3	99	149,8 ± 1,8		
64	38,4 ± 1,5	109	200,2 ± 2,3		
71	200,0 ± 1,5	113	30,4 ± 1,6		

ЧСА-связывающую область только с двумя ГА-модулями, удалось избежать такой проблемы. Новая тест-система была успешно применена при определении микроальбуминурии в клинических пробах мочи. Микрочиповая технология позволила быстро выявить пациентов с микро- и макроальбуминурией, а дальнейший анализ в количественной тест-системе позволил определить точные концентрации ЧСА в моче этих пациентов.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследование не имело спонсорской поддержки.*

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 4—14 см. REFERENCES)

2. Ларичева Е.С., Мнускина М.М., Козлов А.В., Зайчик А.М. Определение концентрации альбумина в моче с помощью гетерогенного твердофазового конкурентного рецепторного анализа. *Эффективная терапия*. 2007; 13(4): 27—31.
3. Хаишева Л.А., Кательницкая Л.И. Микроальбуминурия как фактор прогноза сердечно-сосудистых осложнений и маркер эффективности терапии у пациентов с артериальной гипертонией. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2008; 4(1): 51—5.
15. Гупалова Т.В., Бормотова Е.А., Гладилина М.М., Тотолян А.А. Получение и характеристика рекомбинантного альбумин-связывающего полипептида стрептококка группы G для диагностики диабетической нефропатии. *Биотехнология*. 2012; (3): 75—84.
16. Бормотова Е.А., Суворов А.Н., Гупалова Т.В. Получение рекомбинантных полипептидов стрептококка группы G и анализ их способности связывать альбумин человека. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина*. 2014; (3): 74—84.
17. Фримель Г. *Иммунологические методы*. М.: Медицина; 1987.

Поступила 15.03.16

REFERENCES

1. Weir M.R. Microalbuminuria and cardiovascular disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 2(3): 581—90.
2. Larucheva E.S., Mnuskina M.M., Kozlov A.V., Zaychuk A.M. Determination of the albumin concentration in the urine using the heterogeneous solid phase competitive receptor assay. *Efferentnaya terapiya*. 2007; 13(4): 27—31. (in Russian)
3. Khaisheva L.A., Katel'nitskaya L.I. Microalbuminuria as a prognostic factor of cardiovascular complications and a marker of treatment efficacy in patients with hypertension. *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii*. 2008; 4(1): 51—5. (in Russian)

4. De Zeeuw D., Parving H.H., Henning R.H. Microalbuminuria as an early marker for cardiovascular disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17(8): 2100—5.
5. Comper W.D., Osicka T.M., Clark M., MacIsaac R.J., Jerums G. Earlier detection of microalbuminuria in diabetic patients using a new urinary albumin assay. *Kidney Int.* 2006; 65(5): 1850—5.
6. Myhre E.B., Kronvall G. Demonstration of specific binding sites for human serum albumin in group C and G streptococci. *Infect. Immun.* 1980; 27(1): 6—14.
7. Widebäck K., Havlíček J., Kronvall G. Demonstration of a receptor for mouse and human serum albumin in *Streptococcus pyogenes*. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. B.* 1983; 91(6): 373—82.
8. Johansson M.U., de Chateau M., Björck L., Forsen S., Drakenberg T., Wikstrom M. The GA module, a mobile albumin-binding bacterial domain, adopts a three-helix-bundle structure. *FEBS Lett.* 1995; 374(2): 257—61.
9. Johansson M.U., Nilsson H., Evenas J., Forsen S., Björck L., Wikstrom M. Differences in backbone dynamics of two homologous bacterial albumin-binding modules: implications for binding specificity and bacterial adaptation. *J. Mol. Biol.* 2002; 316(5): 1083—99.
10. de Chriteau M., Björck L. Protein PAB, a mosaic albumin-binding bacterial protein representing the first contemporary example of module shuffling. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(16): 12147—51.
11. Akerström B., Nielsen E., Björck L. Definition of IgG- and albumin-binding regions of streptococcal protein G. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 13388—91.
12. Sjöbring U., Falkenberg C., Nielsen E., Akerström B., Björck L. Isolation and characterization of a 14-kDa albumin-binding fragment of streptococcal protein G. *J. Immunol.* 1988; 140: 1595—9.
13. Nygren P.A., Eliasson M., Abrahamson L., Uhlén M., Palmcrantz E. Analysis and use of the serum albumin binding domains of streptococcal protein G. *J. Mol. Recognit.* 1988; 1(2): 69—74.
14. Sjöbring U. Isolation and molecular characterization of a novel albumin-binding protein from group G streptococci. *Infect. Immun.* 1992; 60(9): 3601—8.
15. Gupalova T.V., Boromotova E.A., Gladilina M.M., Totolyan A.A. Obtaining and characteristics of a recombinant albumin-binding polypeptide from G group streptococcus for diabetic nephropathy diagnostics. *Biotekhnologiya*. 2012; (3): 75—84. (in Russian)
16. Boromotova E.A., Suvorov A.N., Gupalova T.V. Production of recombinant polypeptides of group G streptococcus and analysis of their ability to bind human serum albumin. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Seriya 11. Meditsina*. 2014; (3): 74—84. (in Russian)
17. Frimel' G. *Immunological Methods [Immunologicheskie metody]*. Moscow: Meditsina; 1987. (in Russian)

Received 15.03.16