

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Данилова Е.Ю.^{2,3}, Васалатий И.М.¹, Носырев А.Е.^{1,2}, Мальцева Л.Д.¹, Морозова О.Л.¹

МЕТАБОЛОМ МОЧИ В ДИАГНОСТИКЕ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119990, Москва, Россия;

²ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В. П. Сербского, Национальный научный центр наркологии, 119002, Москва, Россия;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», химический факультет, 119991, Москва, Россия

Важнейшая особенность диагностики хронической болезни почек (ХБП) – отсутствие репрезентативных методов, выявляющих повреждение почек на ранней стадии заболевания. Несвоевременная диагностика, особенно в детском возрасте, повышает риск развития осложнений и снижает эффективность возможного лечения. Цель работы – продемонстрировать современные подходы к поиску новых маркеров ХБП, основанных на применении омических метаболомных технологий. В базах данных Web of Science, Scopus и РИНЦ отобрали 61 релевантный источник, содержащий актуальные данные клинических и научных исследований по теме данного обзора. Отмечены основные свойства биомаркеров ХБП: чувствительность и специфичность, четкая связь с определённым звеном патогенеза, способность определить повреждение почек на раннем этапе, доступность для измерения в клинической практике. Определены базовые патогенетические механизмы развития ХБП: потеря функционирующих нефронов, повреждение извитых канальцев, воспаление и фиброз, – биохимические субстраты которых могут являться подходящими биомаркерами. В качестве наиболее перспективного метода поиска биомаркеров мы рассмотрели масс-спектрометрию в сочетании с различными модификациями ввода пробы. Провели сравнение классического целевого метода, изучающего конкретные соединения, и нетаргетного анализа, измеряющего спектр метаболитов с дальнейшей статистической обработкой. Представлена характеристика основных метаболомных исследований, сформировавших панели биомаркеров для почечной дисплазии у детей, гломерулопатий, диабетической и мембранозной нефропатий. ХБП – неуклонно прогрессирующее полиэтиологичное заболевание, требующее применения методов ранней диагностики, особенно в педиатрической практике. Изучение механизмов повреждения почек и совершенствование технологий анализа метаболома способствует открытию новых биомаркеров, необходимых для ранней диагностики, прогнозирования течения болезни и дальнейшего выбора оптимальной персонализированной терапии.

Ключевые слова: хроническая болезнь почек; метаболом; биомаркер; врождённые уропатии.

Для цитирования: Данилова Е.Ю., Васалатий И.М., Носырев А.Е., Мальцева Л.Д., Морозова О.Л. Метаболом мочи в диагностике хронической болезни почек (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (5): 253-260. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-5-253-260>

Для корреспонденции: Морозова Ольга Леонидовна, д-р. мед. наук, проф. каф. патофизиологии; e-mail: morozova_ol@list.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 14.09.2022

Принята к печати 03.02.2023

Опубликовано 15.05.2023

Danilova E.Yu.^{2,3}, Vasalatiy I.M.¹, Nosyrev A.E.^{1,2}, Maltseva L.D.¹, Morozova O.L.¹

URINE METABOLOME IN THE DIAGNOSIS OF CHRONIC KIDNEY DISEASE (REVIEW OF LITERATURE)

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia (Sechenov University), 119990, Moscow, Russia;

²National Research Center on Addictions, branch of V. Serbsky NMRCPN, 119002, Moscow, Russia;

³Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow 119991, Russia

The most important feature of the diagnosis of chronic kidney disease (CKD) is the absence of representative methods that detect kidney damage at an early stage of the disease. Late diagnosis, especially in childhood, increases the risk of complications and reduces the effectiveness of possible treatment. Aim – to demonstrate modern approaches to the search for new CKD biomarkers based on the use of omics metabolomic technologies. In the Web of Science, Scopus and RSCI databases, 61 sources were selected that contained relevant data from clinical and scientific researches on the topic of this review. The main properties of CKD biomarkers are noted: sensitivity and specificity, a clear connection with a certain link in pathogenesis, the ability to determine kidney damage at an early stage, and availability for measurement in clinical practice. The basic pathogenetic mechanisms of CKD development have been determined, whose biochemical substrates may be suitable biomarkers: loss of functioning nephrons, damage to the convoluted tubules, inflammation and fibrosis. We have considered mass-spectrometry in combination with various injection modifications as the most promising method for the search for biomarkers. We compared the classical target method, which studies specific compounds, and non-targeted analysis, which measures the spectrum of metabolites with further statistical processing. We also provided a description of the main metabolomic studies that formed panels of biomarkers for renal dysplasia in children, glomerulopathies, diabetic and membranous nephropathies. CKD is a steadily progressing polyetiological disease

that requires the use of early diagnostic methods, especially in pediatric practice. The study of the mechanisms of kidney damage and the improvement of metabolome analysis technologies contribute to the discovery of new biomarkers necessary for early diagnosis, prognosis of the course of the disease and further selection of optimal personalized therapy.

Key words: *chronic kidney disease; metabolome; biomarker; congenital uropathy.*

For citation: Danilova E.Yu., Vasalati I.M., Nosyrev A.E., Maltseva L.D., Morozova O.L. Urine metabolome in the diagnosis of chronic kidney disease (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (5): 253-260 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-5-253-260>

For correspondence: *Morozova O.L.*, Doctor of Medical Sciences, professor, department of Pathophysiology; e-mail: morozova_ol@list.ru

Information about authors:

Danilova E.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-9079-872X>;

Vasalati I.M., <https://orcid.org/0000-0001-5830-0127>;

Nosyrev A.E., <https://orcid.org/0000-0001-8912-2773>;

Maltseva L.D., <https://orcid.org/0000-0002-4380-4522>;

Morozova O.L., <https://orcid.org/0000-0003-2453-1319>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 14.09.2022

Accepted 03.02.2023

Published 15.05.2023

Введение. Широкая распространённость хронической болезни почек (ХБП) и её негативное влияние на качество жизни людей делает ХБП социально значимой формой патологии [1]. Согласно данным систематических обзоров и популяционных исследований, распространённость ХБП всех стадий в детской популяции составляет 1%, глобальная распространённость ХБП составляет 11-13%, что превосходит распространённость сахарного диабета [2]. Частота заместительной почечной терапии в педиатрической практике составляет от 15-30 пациентов на 1 млн. детей в странах восточной Европы, до 100 на 1 млн. детей в Финляндии и США. По данным ВОЗ, в 2016 году ХБП стала причиной 1 180 000 смертей, что поставило её на 12-е место в списке лидирующих причин смертности. Прогнозируется рост смертности от ХБП с 16 случаев на 100 000 населения в 2016 году до 19 случаев на 100 000 в 2030 году [3]. К развитию ХБП может привести множество этиологических факторов и заболеваний, по мере ухудшения функции почек, вне зависимости от этиологии, у пациентов снижается качество жизни и повышается риск смерти [4]. Современные методы диагностики ХБП выявляют только поздние стадии болезни, что приводит к существованию феномена «слепого пятна» на ранних стадиях ХБП: существует повреждение почек, но репрезентативные способы его выявления отсутствуют. Несвоевременная диагностика повышает риск развития осложнений и снижает эффективность возможного лечения [5].

Диагностика и стадии ХБП основываются на двух лабораторных критериях: сниженной скорости клубочковой фильтрации (СКФ) и альбуминурии. Динамика этих параметров, независимо от возраста, пола, этнической группы и сопутствующих патологий, тесно связана с клиническим прогнозом ХБП. Резкое снижение СКФ является фактором риска неблагоприятных клинических исходов, развития и прогрессирования непосредственно ХБП [6]. СКФ представляется возможным рассчитать, используя как эндогенные (креатинин, цистатин С и др.), так и экзогенные мар-

кёры клубочковой фильтрации (инулин, ^{99m}Tc -ДТПА и др.). Чаще всего используется расчётная скорость клубочковой фильтрации (рСКФ) – математическая конструкция, основанная на концентрации креатинина и/или цистатина С в плазме крови [7]. Согласно современным рекомендациям [8], с целью диагностики и классификации ХБП необходимо рассчитывать СКФ по формуле СКД-ЕРІ, в которой используются элементарные демографические параметры (пол, возраст, раса, рост, креатинин сыворотки). Расчёт СКФ по этой формуле даёт более точные результаты в сравнении с другими формулами, сопоставимые с данными, полученными при оценке клиренса ^{99m}Tc -ДТПА, в том числе и при сохранной функциональной способности почек. Креатинин сыворотки крови, на основе которого производится расчёт, в качестве маркера повреждения почек имеет многочисленные общепризнанные ограничения [9].

Уровень креатинина в сыворотке может зависеть от расы, пола, мышечной массы, статуса гидратации и лекарств; следовательно, изменения креатинина могут не отражать истинных изменений функции почек [10]. В связи с высокими компенсаторно-приспособительными возможностями почки и непрямым зависимостью между уровнем креатинина сыворотки крови и рСКФ сывороточные концентрации креатинина повышаются в сыворотке только в случае повреждения 50-75% почечной паренхимы [5,11,12]. Сывороточный креатинин может увеличиваться без прямого повреждения почек при гиповолемии, применении нестероидных противовоспалительных препаратов или многих других причинах снижения почечной перфузии [13], или напротив, может оставаться неизменным в условиях значительного повреждения канальцев, особенно у пациентов с хорошей основной функцией почек и значительным почечным резервом [10]. Чтобы устранить эти ограничения, исследования с использованием новых технологий сосредоточены на выявлении структурных маркеров повреждения почечных канальцев в моче или системном кровотоке, которые непосредственно производятся почками

или накапливаются в результате дисфункции канальцевых клеток после повреждения почек [14].

Цель обзора – демонстрация современных подходов к поиску новых маркёров ХБП, основанных на применении омиксных метаболомных технологий. Рассмотрены потенциальные и существующие источники этих маркёров, лабораторные методы, с помощью которых маркёры можно обнаружить, возможности и ограничения этих методов.

Понятие биомаркёра и требования к нему. Биомаркёр – молекулярная, гистологическая, рентгенографическая или физиологическая характеристика, которая является индикатором или предиктором нормального биологического процесса, патологического процесса или реакции на терапевтическое вмешательство.

К «идеальному» биомаркёру предъявляются многочисленные требования. Помимо хороших преаналитических свойств, такой маркёр должен быть чувствительным, специфичным, точным и надёжным, быстро реагировать на любое повреждение почек, его измерение должно быть стандартизированным, простым, быстрым, недорогим. «Идеальный» биомаркёр должен быть связан с определённым звеном патогенеза ХБП, что позволило бы отслеживать интенсивность тех или иных патологических процессов при ХБП. Биомаркёр должен позволить диагностировать повреждение почек до истощения почечного резерва и лабораторно диагностируемого снижения их функции [12]. Биомаркёры, доступные в клинической практике, не сочетают в себе всех этих качеств. Вероятно, подобный «идеальный» маркёр никогда не будет обнаружен. ХБП – неоднородное, комплексное и полиэтиологическое заболевание, для всесторонней оценки которого может потребоваться целая панель биомаркёров. За счёт использования набора биомаркёров возможно получить подробную информацию об этиологии, морфологических и функциональных изменениях в паренхиме почки, степени повреждения почек с целью определения прогноза течения и возможных исходов заболевания [12, 13].

Патогенез ХБП. Вне зависимости от этиологии повреждающего фактора, в основе ХБП лежат схожие патогенетические механизмы: потеря функционирующих нефронов, повреждение извитых канальцев, воспаление, фиброз. В ответ на повреждающий фактор любой этиологии в паренхиме почки развивается воспалительная реакция с нейтрофильной и макрофагальной инфильтрацией, и пролиферацией мезангиальных клеток [15]. Сокращение количества функционирующих нефронов приводит к развитию процесса гиперfiltrации в интактных нефронах. Это позволяет компенсировать недостаток действующих нефронов, однако существенно увеличивает оказываемую на них нагрузку [16]. Возросшее клубочковое давление и гиперfiltrация стимулируют высвобождение рецептора к фактору некроза опухоли альфа/эпителиальному фактору роста (TNF- α /EGF-R), активация которого стимулирует гипертрофию нефрона [16, 17]. Гипертрофия клеток нефрона позволяет снизить клубочковое давление, за счёт увеличения площади filtration [18]. Это может приводить к по-

вреждению подоцитов и ремоделированию filtrationционного барьера, что повышает его проницаемость, и клинически проявляется альбуминурией/протеинурией [19]. Альбумин и белки системы комплемента, проходящие сквозь filtrationционный барьер, наряду с инфильтрирующими повреждённую ткань иммунными клетками, стимулируют выделение профибротических цитокинов клетками клубочков, что ведёт к поддержанию провоспалительного микроокружения и инициации процессов фиброза [20–23]. Массивное разрастание соединительной ткани приводит к тканевой и циркуляторной гипоксии, которая способствует повреждению клубочкового и канальцевого аппарата почки, тем самым замыкая «порочный круг» патогенеза ХБП [24, 25]. Процессы, протекающие в паренхиме почек при ХБП, ведут к её ремоделированию: изменению метаболизма, количественного и качественного состава белков и структуры ткани.

Изменение состава биологических жидкостей и тканей представляет возможность использовать ряд белковых и небелковых молекул, связанных с определёнными звеньями патогенеза ХБП в качестве биомаркёров. Концентрацию таких биомаркёров можно измерять непосредственно в биопсийном материале, гораздо более перспективным является анализ биологических жидкостей, в особенности крови и мочи. Эти биологические среды могут чётко отражать как патофизиологические процессы, происходящие непосредственно в почках, так и системные изменения [11]. Кровь и мочу можно получить в достаточном объёме для проведения сразу нескольких анализов и при этом методы сбора малоинвазивны. Это является существенным преимуществом и для пациентов, так как повторный сбор биоматериала не будет доставлять им существенных неудобств, и для исследователей из-за невысокой себестоимости процедур взятия биоматериала. Многочисленными исследованиями показана связь между течением ХБП и её осложнений и концентрацией ряда молекул в крови и/или моче: в том числе структурных белков (коллагены разных типов), биомаркёров повреждения канальцев, воспаления, фиброза, гипоксии [26–28].

Омиксные технологии для анализа биомедицинских объектов. Возможность увеличить группы показателей, содержание которых в биологическом образце можно оценить одновременно, привело к образованию группы омиксных технологий [29–31]. В зависимости от типа анализируемых звеньев этого процесса их делят на транскриптомику, протеомику, метаболомику и геномику.

Метаболомика – анализ молекул размером менее 1000 Да, трансформирующихся в результате метаболизма организма и поддерживающих его гомеостаз [32]. Метаболомом называется полный набор метаболитов, которые могут синтезироваться и разрушаться в тканях или биологических жидкостях организма при физиологических и патологических состояниях. В изучении метаболома мочи применяется целевой метод, ориентированный на поиск и изучение групп конкретных соединений, и нетаргетный подход, измеряющий огромный спектр метаболитов с приме-

нением продвинутых инструментов статистической обработки данных. Полученные результаты позволяют формировать новые гипотезы об этиопатогенезе заболевания и проводить тщательную диагностику и характеристику ХБП у пациента, согласно основным принципам персонализированной медицины [32].

Определённые алгоритмы машинного обучения, такие как метод опорных векторов, позволяют объединять ряд биомаркёров в классификатор, диагностические и прогностические возможности которого будут превосходить анализ концентрации отдельных биомаркёров [33]. У такого подхода есть существенное ограничение – на основе малых выборок есть риск генерации классификатора, который, в конечном итоге, не будет эффективен в других выборках [34]. Проверка эффективности созданного мультимаркёрного классификатора на независимой когорте является ключевой задачей любого исследования в данном направлении [35].

Развивается метод анализа проб, не требующий идентификации веществ, – нетаргетное профилирование. Нетаргетный анализ основан на определении и сравнении концентраций множества химических соединений, так называемых «профилей» или «образов» проб [36]. Потенциально возможно определить метаболический профиль любой патологии при условии стремления к минимально возможной фрагментации соединений на этапе ионизации и регистрации максимального числа пиков метаболитов. У такого метода есть особенности, обусловленные тем, что интерпретация результатов происходит за счёт математической и статистической обработки данных большой выборки проб. Результаты такого нетаргетного анализа возможно получить с помощью дополнительных биоинформатических инструментов [37].

Изучение основных звеньев патогенеза ХБП и развитие омиксных технологий, в том числе метаболомики, позволят выявлять новые биомаркёры при заболеваниях почек [11, 12]. Внедрение аналитических методов масс-спектрометрии в исследовательскую практику позволило идентифицировать и количественно определять белки и пептиды в тканях и биологических жидкостях [32]. Обладая широкими возможностями для одновременного определения большого числа различных веществ, масс-спектрометрия (МС) позволяет не только проводить количественный и качественный анализ известных или потенциальных биомаркёров в образцах для диагностики патологий, но и искать новые [38, 39]. Разработка методик МС анализа с высокой разрешающей способностью, возможностью количественного анализа и высокой пропускной способностью позволила расширить объем наших знаний о метаболитах, участвующих в различных клеточных и биологических путях [40].

МС является инструментальным методом анализа, основанным на образовании, разделении и определении ионов в газовой фазе. Разделение ионов происходит в камере масс-анализатора спектрометра. Идентификация и количественное определение молекул происходит благодаря измерению уровня сигнала отношения массы к заряду ионов (m/z) определяемого вещества [41, 42]. Если описывать процессы поэтапно, то сначала пробу

вносят через систему ввода, работающую при высокой температуре и низком давлении, проба испаряется и далее попадает в ионизатор [41]. Ионы разделяются в магнитном поле спектрометра из-за различий в массе и заряде, определяющих кинетическую энергию, и регистрируются ионным детектором [41–43].

Существующие модификации МС методов основаны на внесении изменений в описанные ранее стадии работы с пробой. Большая часть таких вариаций существует для первого этапа анализа – ввода пробы в масс-спектрометр. Совмещение процессов разделения сложной смеси, отделения интересующего нас типа маркёров хроматографическими методами и последующего ввода в систему масс-спектрометра является одной из самых распространённых [44, 45]. Среди таких tandemных МС методов встречается использование перед масс-спектрометрическим определением газовой хроматографии (ГХ), жидкостной хроматографии (ЖХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и капиллярного электрофореза (КЭ) [46–48].

Выбор типа tandemного масс-спектрометрического метода основывается не только на том, в какой фазе, газовой или жидкостной, находятся маркёры, но и по совокупности преимуществ и недостатков упомянутых методов разделения веществ. Неоспоримым преимуществом ГХ-МС является наличие спектральных библиотек, облегчающих идентификацию биомаркёров, воспроизводимость и высокая чувствительность [46].

Слабой стороной масс-спектрометрии как метода является необходимость использования дорогих и сложных масс-анализаторов, требующих квалификации химика-аналитика. В ряде случаев для проведения анализа требуется дополнительная пробоподготовка, включающая в себя, например твёрдофазную экстракцию [48, 49] или дериватизацию анализируемого вещества [50, 51].

Первые исследования, совмещающие метаболомику и tandemную МС для изучения различных нефропатий, были опубликованы ещё до 2011 года [52, 53]. Мультимаркерный подход продолжает свое развитие и количество исследовательских работ растёт, поэтому рассмотрим результаты ключевых исследований последних лет, посвящённых данной теме, полученных с помощью различных видов tandemной хромато-масс-спектрометрии (см. таблицу).

Методы на основе газовой хроматографии часто используются в современных метаболомных исследованиях. Для проведения анализа методом ГХ-МС пробу необходимо подготовить – перевести её в газовую фазу физическими (микротвёрдофазная экстракция из паровой фазы, испарение, отбор пара над пробой без дополнительного концентрирования) или химическими (дериватизация соединений) методами. Клинические лаборатории гораздо чаще имеют доступ именно к tandemным ГХ-МС, и поэтому полученные панели биомаркёров возможно проще внедрять в качестве дополнения к существующим способам диагностики.

Процесс метилирования гуанидиновой (NG) группы катализируется ферментом протеин-аргининме-

Аналитические методы и результаты метаболомных исследований различных вариантов нефропатий

Метод определения	Диагноз	Биомаркёры	Авторы
ГХ-МС, ЖХ-МС	Почечная дисплазия в детском возрасте	Снижение концентрации: ацилкарнитины, индоксилсульфат, ксантин, глутамин, аконитат; повышение концентрации: лактат, диметилгуанозин, гуанидиносукцинат	S. Macioszek и соавт. [61]
ГХ-МС	Отторжение почечного трансплантата	Снижение концентрации диметиларгинина, смещение процесса диметилирования аргинина к асимметричной форме	A. Post и соавт. [54]
ГХ-МС	Отторжение почечного трансплантата	Повышение концентрации: глицин, N-метилаланин, инулобиоза, мио-инозитол	T. K. Sigdel и соавт. [56]
ГХ-МС	Гломерулопатии	Повышение концентрации: метилгексадеканат, 9-гексадецен-1-ол, 6,10-диметил-5,9-ундекадиен-2-он и 2-пентанон	T. Ligor и соавт. [48]
ГХ-МС	Острое повреждение почек у детей	Разработан экономный классификатор из 13 метаболитов метаболитов мочи для выявления риска ОПП в педиатрической популяции раньше, чем текущий стандарт диагностики	A. Franiek и соавт. [55]
ГХ-МС	Мембранозная нефропатия	Повышение концентрации: дикарбоновые кислоты, гидроксильные кислоты, фенольные кислоты, промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот, сахарные спирты, цитозин, хинолиновая кислота, холестерин	X. Gao и соавт. [57]
ЖХ-МС	Почечный фиброз при ХБП	Повышение концентрации: лизофосфатидная кислота и лизофосфатидилхолин	K. Mirzoyan и соавт. [58]
ЖХ-МС	Диабетическая нефропатия	Повышение концентрации: конечные продукты гликирования, дикарбонильные соединения (гидроимидазолона метилглиоксаль (MG-HI), Nε-карбоксиметил-лизин (CML), глюкозепан, D-лактат)	N. Rabbani и соавт. [59]
ЖХ-МС	Диабетическая нефропатия	Повышение концентрации: линолевая кислота, γ-линоленовая кислота, янтарная кислота, L-яблочная кислота, цис-аконитовая кислота, лимонная кислота, L-пролин, L-эритро-4-гидроксиглутамат, N-метилгидантоин, N-карбамоилпутресцин, спермидин и 5-аминопентановая кислота	Q. Feng и соавт. [60]

тилтрансферазой, который использует универсального донора метильных групп S-аденозилметионина (SAM) в качестве кофактора [54]. Arg-метилирование начинается с образования белков NG-моно-метиларгинина (ММА), которые затем метилируются с образованием асимметричного NG,N^oG-диметиларгинина (АДМА) или симметричного NG,N^oG-диметиларгинина (СДМА). В организме СДМА практически не метаболизируется и выводится почками в неизменённом виде, в то время как АДМА метаболизируется до диметиламина, и только 10% оставшегося АДМА выводится почками. A. Post и соавт. [54] в своём исследовании измерили экскрецию ДМА, АДМА, СДМА у реципиентов почечного трансплантата и здоровых доноров почек с помощью метода ГХ-МС. Обнаружено, что снижение концентрации ДМА у реципиентов почечного трансплантата прямо коррелировало с повышением показателей общей смертности, в качестве диагностического биомаркёра исследователи отметили смещение процесса диметилирования аргинина от симметричной к асимметричной форме [54].

Доказано, что помимо общеизвестных биомаркёров повреждения почек, таких как цистатин С, NGAL, KIM-1, IL-18, в диагностике гломерулопатий возможно использование летучих органических соединений (ЛОС) мочи [48]. С помощью метода двухмерной ГХ в сочетании с времяпролётной масс-спектрометрией определено 4 метаболита: метилгексадеканат, 9-гексадецен-1-ол, 6,10-диметил-5,9-ундекадиен-2-он и 2-пентанон, представляющих статистически значи-

мые различия концентраций в моче между пациентами с гломерулярными болезнями и контрольной группой. Достоверно увеличенные площади пиков вышеперечисленных летучих органических соединений в исследуемой группе подтверждают целесообразность их использования в качестве прямых диагностических биомаркёров гломерулопатий [48].

Исследование нелетучих соединений группой A. Franiek и соавт. [55] методом ГХ так же показало возможность создания метаболомного классификатора для обнаружения риска возникновения повреждения почек у детей. Для применения ГХ 94 отобранные пробы предварительно дериватизированы коммерческим набором изотопно-меченых соединений. Такой подход позволил составить диагностическую панель, состоящую из 193 метаболитов, ранжированных по важности вклада в определение фактора риска. Девять метаболитов из ранжированных 20 для классификатора уже встречались в предыдущих работах. Авторы связывают изменение их концентрации в образцах с началом клубочкового воспаления, нарушением осмотического баланса в тканях и окислительным стрессом [55].

Исследованы метаболомные профили образцов мочи 310 реципиентов почечного трансплантата с помощью метода ГХ-МС [56]. Сформирована целевая панель из 11 метаболитов, способных обнаружить острое отторжение трансплантата с чувствительностью до 92,9% и специфичностью до 96,3%. Из представленной панели наиболее значимыми метаболитами являются глицин, N-метилаланин, инулобиоза и мио-ино-

зитол, играющий важную роль в защите клеток почечных канальцев от гиперосмотического эффекта [56].

Методом ГХ-МС выполнен метаболомный анализ мочи 30 пациентов с мембранозной нефропатией, разделённых на группу с протеинурией более 3,5 г/сут и менее 3,5 г/сутки [57]. Сравнение данных групп позволило обнаружить 26 мочевых метаболитов, концентрации которых преимущественно повышены в группе с выраженной протеинурией. По результатам проведённого анализа авторы отмечают высокие показатели окислительного стресса у пациентов с выраженной протеинурией [57].

Несмотря на все преимущества метод ГХ все-таки требует добавления стадии специальной пробоподготовки, которая может влиять на метаболомный профиль. Пробоподготовка, даже с применением методов физического испарения пробы или химической дериватизации, не позволяет анализировать ряд нелетучих соединений. Для анализа жирных кислот, производных сахаров и нуклеотидов чаще применяется ЖХ-МС.

Исследована роль лизофосфатидной кислоты (ЛФК) и её производных в развитии фиброза паренхимы почек на моделях субтотальной нефрэктомии, как способа искусственного развития ХБП [58]. По результатам анализа спектра лизофосфолипидов мочи методом ЖХ-МС определено повышение концентрации пяти подвидов лизофосфатидной кислоты (ЛФК 16:0, ЛФК 18:0, ЛФК 18:1, ЛФК 18:2, ЛФК 20:4) у мышей после нефрэктомии по сравнению с контрольной группой. Повышение концентрации ЛФК в моче напрямую связано с увеличением концентрации лизофосфатидилхолина (ЛФХ). Авторы подчёркивают, что ЛФК и ЛФХ являются специфическими мочевыми маркерами почечного фиброза и не отражаются количественно в метаболоме плазмы крови, их уровни напрямую коррелируют со степенью тубулоинтерстициального фиброза и показателями альбумин-креатининового соотношения [58].

При ХБП, в особенности при диабетической нефропатии, отмечается снижение активности фермента гликоксилазы 1 (Glo1), что приводит к накоплению конечных продуктов гликирования (КПГ) и дикарбонильных соединений по типу гидроимидазолон метилглиоксала (MG-HI), Nε-карбоксиметил-лизина (CML), глюкозепана, D-лактата [59]. КПГ являются компонентами посттрансляционных модификаций белков, накапливаются в плазме крови, фильтруются почками и выводятся с мочой. Надёжное определение конечных продуктов гликирования в моче возможно с помощью метода ЖХ-МС. Накопление дикарбонильных соединений приводит к развитию почечного фиброза, что подтверждает критическую роль этих соединений как диагностических и прогностических биомаркеров течения хронической болезни почек [59].

Исследована ХБП на примере диабетической болезни почек (ДБП), сравнивая метаболомные профили мочи пациентов с альбуминурической формой (АДБП), нормальными показателями экскреции альбумина с мочой (НАДБП) и контрольную группу [60]. Методом ЖХ-МС определено 65 метаболитов со статистически значимыми различиями концен-

траций между представленными группами, причём большая часть этих молекул являлась звеном одного из трёх метаболических путей: цикл линолевой кислоты, цикл трикарбоновых кислот или пути метаболизма аргинина и пролина. В дальнейшем для поиска достоверных диагностических маркёров НАДБП из вышеописанных метаболитов, изученных ненаправленным методом метаболомики, применён ортогональный частичный дискриминантный анализ. По результатам исследования 12 метаболитов: линолевая кислота, γ-линоленовая кислота, янтарная кислота, L-яблочная кислота, цис-аконитовая кислота, лимонная кислота, L-пролин, L-эритро-4-гидроксиглутамат, N-метилгидантоин, N-карбамоилпутресцин, спермидин и 5-аминопентановая кислота, – стали панелью диагностических маркёров, способных дифференцировать группы пациентов АДБП и НАДБП [60].

Метод ЖХ-МС предназначен преимущественно для нелетучих соединений и подразумевает таргетный подход к определению биомаркеров с предварительным изучением метаболомных библиотек и подбором групп потенциально перспективных соединений, участвующих в патогенезе ХБП. При использовании ГХ-МС возникает необходимость подбора оптимальной концентрации растворителя и наличие специальных хроматографических колонок, что ограничивает его широкое использование.

Тандемные ГХ-МС и ЖХ-МС не позволяют создать универсальный метод анализа для всех потенциальных метаболитов. Чаще всего разрабатывается методика для нескольких классов веществ, определяемых комбинацией методов, позволяющей определять изменения интересующих метаболических показателей.

Применён метаболомный анализ для изучения основных изменений в биохимических параметрах у детей с почечной дисплазией [61]. Для формирования метаболомного профиля мочи совместно использованы методы тандемной ГХ и ЖХ с МС-детектированием. При сравнении проб детей с почечной дисплазией и испытуемых контрольной группы, многофакторный дискриминантный анализ определил 19 метаболитов, с достоверно различающимися концентрациями в моче. Основные изменения включают в себя снижение уровней ацилкарнитиннов, индоксилсульфата, ксантина, глутамина и аконитата, повышение уровней лактата, диметилгуанозина, гуанидиносукцината в моче пациентов. Авторами сделан вывод, что при почечной дисплазии у детей нарушаются процессы регуляции гликолиза (эффект Варбурга), орнитинового цикла, цикла трикарбоновых кислот, обмена пуринов и биосинтеза жирных кислот [61]. Такой подход является наиболее перспективным.

Заключение. Описан передовой опыт нескольких исследовательских групп, занимавшихся изучением метаболома мочи и поиском потенциальных биомаркёров заболеваний почек и мочеполовой системы с помощью методов ГХ-МС и ЖХ-МС. Продемонстрирована возможность создания панелей прогностических и диагностических биомаркёров почечной дисплазии у детей, биомаркёров гломерулопатий, диабетической и мембранозной нефропатий, в которых основным и

репрезентативным для метаболома звеном патогенеза рассматривали процесс почечного фиброза.

ХБП является социально значимым заболеванием, приводящим к снижению качества жизни и к ранней потере трудоспособности. Согласно эпидемиологическим прогнозам, значение ХБП для мирового здравоохранения будет только расти. Основная проблема ведения пациентов с ХБП – ограниченные возможности современных маркеров заболевания, которые позволяют диагностировать повреждение почек только после истощения почечного резерва и гибели существенной части нефронов. Несмотря на то, что хроническая болезнь почек – полиэтиологичное заболевание, в его патогенезе лежат одни и те же механизмы, вне зависимости от первичного повреждающего фактора. В связи с большой вариабельностью физико-химических свойств метаболитов при данном заболевании необходимо охватывать всё большие диапазоны метаболома для поиска и открытия новых биомаркеров. Существует множество инструментальных и статистических подходов к поиску новых биомаркеров, тенденция последних лет демонстрирует необходимость применения мультиплатформенной метаболомики, сочетающей параллельное применение тандемных хромато-масс-спектрометрических методов (ГХ-МС, ЖХ-МС), и мультикомпаратментной метаболомики с целью создания мультимаркерных классификаторов и панелей метаболомных биомаркеров.

Результаты исследований показывают, что большая часть биомаркеров ХБП являются звеньями метаболизма углеводов, жирных кислот, ацилкарнитинов, пуринов, аминокислот. Выбор мочи в качестве изучаемой среды оказался целесообразным в связи с быстрым изменением её метаболома в ответ на повреждение почки. Применение МС метода в практике изучения патогенеза ХБП и поиска ранних биомаркеров показало высокую точность и производительность. С помощью аналитических методов тандемной хромато-масс-спектрометрии исследовательские группы смогли создать диагностические панели для диабетической болезни почек, гломерулопатий и нефропатий, определены группы биомаркеров отторжения почечного трансплантата. Поиск ранних биомаркеров развития патологии ХБП у детей в связи с быстрым прогрессированием является исключительно важным, поэтому особенную актуальность имеет метаболомное исследование проб детей с почечной дисплазией, проведенное группой S. Maciozsek и соавт. [61]. Необходимо в дальнейшем определить оптимальные модификации масс-спектрометрического метода, параллельно сравнивая их с другими неинвазивными методами анализа метаболома мочи, стремиться к увеличению исследуемых групп пациентов с ХБП и высокоточной их стратификации по этиологии и стадии болезни.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-7, 9-61 см. REFERENCES)

8. Национальные рекомендации. Хроническая болезнь почек: основные принципы скрининга, диагностики, профилактики и подходы к лечению. *Нефрология*. 2012; 16(1):89-115. DOI: 10.24884/1561-6274-2012-16-1-89-115.

REFERENCES

1. Taherkhani A., Farrokhi Y.R., Mohseni M., Saidijam M., Arefi Oskouie A. Chronic kidney disease: a review of proteomic and metabolomic approaches to membranous glomerulonephritis, focal segmental glomerulosclerosis, and IgA nephropathy biomarkers. *Proteome Sci.* 2019; 17(1):7. DOI: 10.1186/s12953-019-0155-y.
2. Hill N.R., Fatoba S.T., Oke J.L., Hirst J.A., O'Callaghan C.A., Lasserson D.S., Hobbs F.D. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016; 11(7):e0158765. DOI: 10.1371/journal.pone.0158765.
3. Sleeman K.E., de Brito M., Etkind S., Nkhoma K., Guo P., Higginson IJ, et al. The escalating global burden of serious health-related suffering: projections to 2060 by world regions, age groups, and health conditions. *The Lancet Global Health.* 2019; 7:e883-92. DOI: 10.1016/S2214-109X(19)30172-X.
4. Webster A.C., Nagler E.V., Morton R.L., Masson P. Chronic Kidney Disease. *The Lancet.* 2017; 389(10075):1238-52. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32064-5.
5. Sanchez-Niño M.D., Sanz A.B., Ramos A.M., Fernandez-Fernandez B., Ortiz A. Clinical proteomics in kidney disease as an exponential technology: heading towards the disruptive phase. *Car.* 2017; 10(2):188-91. DOI:10.1093/ckj/sfx0236.
6. Eckardt K.U., Coresh J., Devuyst O., Johnson R.J., Köttgen A., Levey A.S. et al. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *The Lancet.* 2013; 382(9887):158-69. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60439-01.
7. George J.A., Gounden V. Novel glomerular filtration markers. In: *Advances in Clinical Chemistry. Elsevier.* 2019; 88 (4):91-119. DOI: 10.1016/bs.acc.2018.10.005.
8. Smirnov A.V., Shilov E.M., Dobronravov V.A., Kayukov I.G., Bobkova I.N., Shvetsov M.Yu. et al. National guidelines. chronic kidney disease: basic principles of screening, diagnosis, prevention and treatment approaches. *Нефрология (St.-Petersburg)*. 2012; 16(1):89-115. DOI: 10.24884/1561-6274-2012-16-1-89-115. (in Russian)
9. Nickolas T.L., Barasch J., Devarajan P. Biomarkers in acute and chronic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology & Hypertension.* 2008; 17(2):127-32. DOI:10.1097/MNH.0b013e3282f4e525.
10. Zhang W.R., Parikh C.R. Biomarkers of Acute and Chronic Kidney Disease. *Annu. Rev. Physiol.* 2019; 81(1):309-3. DOI: 10.1146/annurev-physiol-020518-114605.
11. Mussap M., Noto A., Fanos V., Van Den Anker J.N. Emerging Biomarkers and Metabolomics for Assessing Toxic Nephropathy and Acute Kidney Injury (AKI) in Neonatology. *BioMed. Research International.* 2014; 2014:1-16. DOI: 10.1155/2014/602526.
12. Rysz J., Gluba-Brzózka A., Franczyk B., Jabłonowski Z., Ciałkowska-Rysz A. Novel Biomarkers in the Diagnosis of Chronic Kidney Disease and the Prediction of Its Outcome. *IJMS.* 2017; 18(8):1702. DOI: 10.3390/ijms18081702.
13. Slocum J.L., Heung M., Pennathur S. Marking renal injury: can we move beyond serum creatinine? *Translational Research.* 2012; 159(4):277-89. DOI:10.1016/j.trsl.2012.01.014.
14. Molin L., Seraglia R., Lapolla A., Ragazzi E., Gonzalez J., Vlahou A. et al. A comparison between MALDI-MS and CE-MS data for biomarker assessment in chronic kidney diseases. *Journal of Proteomics.* 2012; 75(18):5888-97. DOI:10.1016/j.jprot.2012.07.024.
15. Lv W., Booz G.W., Wang Y., Fan F., Roman R.J. Inflammation and renal fibrosis: Recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets. *European Journal of Pharmacology.* 2018; 820:65-76. DOI:10.1016/j.ejphar.2017.12.016.
16. Chagnac A., Zingerman B., Rozen-Zvi B., Herman-Edelstein M. Consequences of Glomerular Hyperfiltration: The Role of Physical Forces in the Pathogenesis of Chronic Kidney Disease in Diabetes and Obesity. *Nephron.* 2019; 143(1):38-42. DOI: 10.1159/000499486.
17. Lindhardt M., Persson F., Currie G., Pontillo C., Beige J., Delles C. et al. Proteomic prediction and Renin angiotensin aldosterone system Inhibition prevention Of early diabetic nephropathy in TType 2 diabetic patients with normoalbuminuria (PRIORITY): essential study design and rationale of a randomised clinical multicentre trial. *BMJ Open.* 2016; 6(3):e010310. DOI: 10.1136/bmjopen-2015-010310.
18. Helal I., Fick-Brosnahan G.M., Reed-Gitomer B., Schrier R.W. Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Nephrol.* 2012; 8(5):293-300. DOI:10.1038/nrneph.2012.19.
19. Romagnani P., Remuzzi G., Glasscock R., Levin A., Jager K.J., Tonelli M. et al. Chronic kidney disease. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2017; 3(1):17088. DOI:10.1038/nrdp.2017.88.

20. Duffield J.S. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2014; 124(6):2299-2306. DOI: 10.1172/JCI72267.
21. Humphreys B.D. Mechanisms of Renal Fibrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 2018; 80(1):309-26. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034227.
22. Wang Y.N., Ma S.X., Chen Y.Y., Chen L., Liu B.L., Liu Q.Q. et al. Chronic kidney disease: Biomarker diagnosis to therapeutic targets. *Clinica Chimica Acta.* 2019; 499:54-63. DOI:10.1016/j.cca.2019.08.030.
23. Schnaper H.W. The Tubulointerstitial Pathophysiology of Progressive Kidney Disease. *Advances in Chronic Kidney Disease.* 2017; 24(2):107-16. DOI:10.1053/j.ackd.2016.11.011.
24. Fu Q., Colgan S.P., Shelley C.S. Hypoxia: The Force that Drives Chronic Kidney Disease. *Clinical Medicine & Research.* 2016; 14(1):15-39. DOI:10.3121/emr.2015.1282.
25. Tanaka S., Tanaka T., Nangaku M. Hypoxia and Dysregulated Angiogenesis in Kidney Disease. *Kidney Dis.* 2015; 1(1):80-9. DOI: 10.1159/000381515.
26. Gupta J., Mitra N., Kanetsky P.A., Devaney J., Wing M.R., Reilly M. et al. Association between Albuminuria, Kidney Function, and Inflammatory Biomarker Profile in CKD in CRIC. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2012; 7(12):1938-46. DOI: 10.2215/CJN.03500412.
27. Nkuipou-Kenfack E., Duranton F., Gayraud N., Argilés À., Lundin U., Weinberger K.M. et al. Assessment of Metabolomic and Proteomic Biomarkers in Detection and Prognosis of Progression of Renal Function in Chronic Kidney Disease. Philippe Rouet PhD, ed. *PLoS ONE.* 2014; 9(5):e96955. DOI:10.1371/journal.pone.0096955.
28. Uwaezuoke S., Ayuk A., Muoneke V., Mbanefo N. Chronic kidney disease in children: Using novel biomarkers as predictors of disease. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* 2018; 29(4):775. DOI:10.4103/1319-2442.239657.
29. Jacob M., Lopata A.L., Dasouki M., Abdel Rahman A.M. Metabolomics toward personalized medicine. *Mass Spec. Rev.* 2019; 38(3):221-38. DOI:10.1002/mas.21548.
30. Sparano J.A., Paik S. Development of the 21-Gene Assay and Its Application in Clinical Practice and Clinical Trials. *J.C.O.* 2008; 26(5):721-8. DOI:10.1200/JCO.2007.15.1068.
31. van Wijck K., van Eijk H.M.H., Buurman W.A., Dejong C.H.C., Lenaerts K. Novel analytical approach to a multi-sugar whole gut permeability assay. *Journal of Chromatography B.* 2011; 879(26):2794-2801. DOI:10.1016/j.jchromb.2011.08.002.
32. Marx D., Metzger J., Pejchinovski M., Gil R.B., Frantzi M., Latoinska A. et al. Proteomics and Metabolomics for AKI Diagnosis. *Seminars in Nephrology.* 2018; 38(1):63-87. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2017.09.007.
33. Mischak H., Vlahou A., Ioannidis J.P.A. Technical aspects and inter-laboratory variability in native peptide profiling: The CE-MS experience. *Clinical Biochemistry.* 2013; 46(6):432-43. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.09.025.
34. Subramanian J., Simon R. Overfitting in prediction models – Is it a problem only in high dimensions? *Contemporary Clinical Trials.* 2013; 36(2):636-41. DOI:10.1016/j.cct.2013.06.011.
35. Schanstra J.P., Zúrbig P., Alkhalaf A., Argiles A., Bakker S.J., Beige J. et al. Diagnosis and Prediction of CKD Progression by Assessment of Urinary Peptides. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2015; 26(8):1999-2010. DOI:10.1681/ASN.2014050423.
36. Coene K.L.M., Kluijtmans L.A.J., van der Heeft E., Engelke U.F.H., de Boer S., Hoegen M. et al. Next-generation metabolic screening: targeted and untargeted metabolomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in individual patients. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2018; 41(3):337-53. DOI: 10.1007/s10545-017-0131-6.
37. Khoomrung S., Wanichthanarak K., Nookaew I., Thamsermsang O., Seubnooch P., Laohapand T. et al. Metabolomics and Integrative Omics for the Development of Thai Traditional Medicine. *Front. Pharmacol.* 2017; 8:474. DOI:10.3389/fphar.2017.00474.
38. Hsu C.W., Chang K.P., Huang Y., Liu H.P., Hsueh P.C., Gu P.W. et al. Proteomic Profiling of Paired Interstitial Fluids Reveals Dysregulated Pathways and Salivary NID1 as a Biomarker of Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Mol. Cell Proteomics.* 2019; 18(10):1939-49. DOI:10.1074/mcp.RA119.001654.
39. Kim K., Aronov P., Zakharkin S.O., Anderson D., Perroud B., Thompson I.M. et al. Urine Metabolomics Analysis for Kidney Cancer Detection and Biomarker Discovery. *Mol. Cell Proteomics.* 2009; 8(3):558-70. DOI:10.1074/mcp.M800165-MCP200.
40. Khamis M.M., Adamko D.J., El-Anead A. Mass spectrometric based approaches in urine metabolomics and biomarker discovery: mass spectrometry in urine metabolomics and biomarker discovery. *Mass Spec. Rev.* 2017; 36(2):115-34. DOI:10.1002/mas.21455.
41. Dass C. Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry. *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry.* 2006; Chapter 1:52-3. DOI: 10.1002/9780470118498.
42. De Hoffmann E., Stroobant V. Mass Spectrometry: Principles and Applications. Somerset: Wiley, 2013; Chapter 1:15-7.
43. Hübschmann H.-J. Handbook of GC-MS: fundamentals and applications; [gas chromatography – mass spectrometry], 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH. 2015; Chapter 2:250-4.
44. Ramautar R., Nevedomskaya E., Mayboroda O.A., Deelder A.M., Wilson I.D., Gika H.G. et al. Metabolic profiling of human urine by CE-MS using a positively charged capillary coating and comparison with UPLC-MS. *Mol. BioSyst.* 2011; 7(1):194-9. DOI: 10.1039/C0MB00032A.
45. Lindon J.C., Nicholson J.K., Holmes E. The Handbook of Metabolomics and Metabolomics. Elsevier Science, 2011; Chapter 5:149-50. http://www.123library.org/book_details/?id=36194.
46. Pasikanti K.K., Ho P.C., Chan E.C.Y. Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2008; 871(2):202-11. DOI:10.1016/j.jchromb.2008.04.033.
47. Yin P., Wan D., Zhao C., Chen J., Zhao X., Wang W. et al. A metabolomic study of hepatitis B-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma by using RP-LC and HILIC coupled with mass spectrometry. *Mol. BioSyst.* 2009; 5(8):868. DOI: 10.1039/b820224a.
48. Ligor T., Zawadzka J., Strączyński G., González Paredes R.M., Wenda-Piesik A., Ratiu I.A. et al. Searching for Potential Markers of Glomerulopathy in Urine by HS-SPME-GC×GC TOFMS. *Molecules.* 2021; 26(7):1817. DOI: 10.3390/molecules26071817.
49. Zhang S., Raftery D. Headspace SPME-GC-MS Metabolomics Analysis of Urinary Volatile Organic Compounds (VOCs). In: Raftery D, ed. Mass Spectrometry in Metabolomics. Vol 1198. Methods in Molecular Biology. Springer New York; 2014; Chapter 17:265-72. DOI: 10.1007/978-1-4939-1258-2_17.
50. Halket J.M., Waterman D., Przyborowska A.M., Patel R.K.P., Fraser P.D., Bramley P.M. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany.* 2005; 56(410):219-43. DOI:10.1093/jxb/eri069.
51. Smon A., Cuk V., Breceelj J., Murko S., Groselj U., Zerjav Tansek M. et al. Comparison of liquid chromatography with tandem mass spectrometry and ion-exchange chromatography by post-column ninhydrin derivatization for amino acid monitoring. *Clinica Chimica Acta.* 2019; 495:446-50. DOI: 10.1016/j.cca.2019.05.007.
52. Boudonck K.J., Mitchell M.W., Németh L., Keresztes L., Nyska A., Shinar D. et al. Discovery of Metabolomics Biomarkers for Early Detection of Nephrotoxicity. *Toxicol. Pathol.* 2009; 37(3):280-92. DOI: 10.1177/0192623309332992.
53. Toyohara T., Akiyama Y., Suzuki T., Takeuchi Y., Mishima E., Tanemoto M. et al. Metabolomic profiling of uremic solutes in CKD patients. *Hypertens. Res.* 2010; 33(9):944-52. DOI:10.1038/hr.2010.113.
54. Post A., Bollenbach A., Bakker S.J.L., Tsikas D. Whole-body arginine dimethylation is associated with all-cause mortality in adult renal transplant recipients. *Amino Acids.* 2021; 53(4):541-54. DOI: 10.1007/s00726-021-02965-1.
55. Franiek A., Sharma A., Cockovski V., Wishart D.S., Zappitelli M., Blydt-Hansen T.D. Urinary metabolomics to develop predictors for pediatric acute kidney injury. *Pediatr. Nephrol.* 2022; 37:2079–90.
56. Sigdel T.K., Schroeder A.W., Yang J.Y.C., Sarwal R.D., Liberto J.M., Sarwal M.M. Targeted Urine Metabolomics for Monitoring Renal Allograft Injury and Immunosuppression in Pediatric Patients. *JCM.* 2020; 9(8):2341. DOI:10.3390/jcm9082341.
57. Gao X., Chen W., Li R., Wang M., Chen C., Zeng R. et al. Systematic variations associated with renal disease uncovered by parallel metabolomics of urine and serum. *BMC Syst. Biol.* 2012; 6(S1):S14. DOI: 10.1186/1752-0509-6-S1-S14.
58. Mirzoyan K., Baïotto A., Dupuy A., Marsal D., Denis C., Vinel C. et al. Increased urinary lysophosphatidic acid in mouse with subtotal nephrectomy: potential involvement in chronic kidney disease. *J. Physiol. Biochem.* 2016; 72(4):803-12. DOI: 10.1007/s13105-016-0518-0.
59. Rabbani N., Thornalley P.J. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. *Kidney International.* 2018; 93(4):803-13. DOI:10.1016/j.kint.2017.11.034.
60. Feng Q., Li Y., Yang Y., Feng J. Urine Metabolomics Analysis in Patients With Normoalbuminuric Diabetic Kidney Disease. *Front. Physiol.* 2020; 11:578799. DOI: 10.3389/fphys.2020.578799.
61. Macioszek S., Wawrzyniak R., Kranz A., Kordalewska M., Struck-Lewicka W., Dudzik D. et al. Comprehensive Metabolic Signature of Renal Dysplasia in Children. A Multiplatform Metabolomics Concept. *Front. Mol. Biosci.* 2021; 8:665661. DOI:10.3389/fmolb.2021.665661.