

## БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Савельева Е. И.<sup>1</sup>, Алюшина Т. И.<sup>1</sup>, Шачнева М. Д.<sup>1</sup>, Добронравов В. А.<sup>2</sup>

### МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ИММУНОГЛОБУЛИН А НЕФРОПАТИЕЙ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ – ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека, 188663, Ленинградская область, м. р-н Всеволожский, г.п. Кузьмолоское, Россия;

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт нефрологии при ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, 197089 Санкт-Петербург, Россия

**Актуальность.** Альтерации кишечного микробиома могут иметь значение для прогрессирования хронических болезней почек.

**Цель** - выявление биомаркеров, ассоциированных с микробиомом, для последующей оценки их клинического и диагностического значения.

**Материал и методы.** Объект анализа - 20 перекодированных (с исключением доступа к персональным данным) образцов сыворотки крови из коллекции НИИ нефрологии: 10 от добровольцев с отсутствием патологии почек и 10 от пациентов с клиничко-морфологически подтвержденным диагнозом иммуноглобулин А нефропатия (IgAN). Для целевого метаболомного анализа разработана методика определения 16 биомаркеров (9 уремических токсинов, холин, 6 аминокислот) методом жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС ВР). Разделение компонентов проводили в режиме обращённофазовой градиентной ВЭЖХ. Детектирование при целевом анализе проводили в режиме регистрации полного ионного тока (FTMS) в сочетании с регистрацией селективных реакций (SRM), при нецелевом анализе использовали режим FTMS.

**Результаты.** Представлены результаты целевого и нецелевого метаболомных исследований образцов сыворотки крови здоровых добровольцев и пациентов с морфологически и клинически подтвержденным диагнозом первичной иммуноглобулин А нефропатии (IgAN). С учётом данных ранее проведённых исследований сформирован перечень потенциальных биомаркеров, ассоциированных с изменениями кишечного микробиома в условиях дисфункции почек и оценена перспективность их дальнейшего исследования и применения в клинической практике. Установлены достоверные различия в содержании фенолсульфата, индолуксусной кислоты, пролина, тирозина, триптофана в образцах сыворотки крови представителей двух обследованных групп. В рамках нецелевого подхода методом дискриминантного анализа с проекцией на латентные структуры (PLS-DA) выявлены достоверные различия в метаболомном профиле сыворотки крови пациентов с установленным диагнозом IgAN и добровольцев с отсутствием данного диагноза.

**Заключение.** Полученные данные указывают на перспективность исследований фенолсульфата, индолуксусной кислоты, пролина, тирозина, триптофана в сыворотке крови для разработки подходов к диагностике нарушений метаболизма у пациентов с IgAN.

**Ключевые слова:** болезни почек; иммуноглобулин А нефропатия; сыворотка крови; уремические токсины; высокоэффективная жидкостная хроматография тандемная масс-спектрометрия; метаболомное исследование

**Для цитирования:** Савельева Е. И., Алюшина Т. И., Шачнева М. Д., Добронравов В. А. Метаболическое профилирование сыворотки крови пациентов с иммуноглобулин А нефропатией методом высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (8): 369-376.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-369-376>

**Для корреспонденции:** Савельева Елена Игоревна, д-р хим. наук, зав. лабораторией аналитической токсикологии; e-mail: [saveleva@rihophe.site](mailto:saveleva@rihophe.site)

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

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-15-00510).

Поступила 07.04.2024

Принята к печати 17.06.2024

Опубликовано 01.08.2024

Savelieva E. I.<sup>1</sup>, Alushina T. I.<sup>1</sup>, Shachneva M. D.<sup>1</sup>, Dobronravov V.A.<sup>2</sup>

### METABOLIC PROFILING OF BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH IMMUNOGLOBULIN A NEPHROPATHY USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY – HIGH-RESOLUTION TANDEM MASS SPECTROMETRY

<sup>1</sup>Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, 188663, Leningrad region, Vsevolozhsky district, Russia;

<sup>2</sup>Research Institute of Nephrology at the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education First St Petersburg Medical University named after. I.P. Pavlov, 197089 St. Petersburg, Russia

**Background.** Alterations in the gut microbiome may be important for the progression of chronic kidney disease.

**Objective** - identification of biomarkers associated with the microbiome for subsequent assessment of their clinical and diagnostic significance.

**Material and methods.** The object of the analysis is 20 recoded (with no access to personal data) blood serum samples from the collection of the Research Institute of Nephrology: 10 from volunteers with no kidney pathology and 10 from patients with a clinical and morphologically confirmed diagnosis of immunoglobulin A nephropathy (IgAN). For targeted metabolomics analysis, a method was developed for the determination of 16 biomarkers (9 uremic toxins, choline, 6 amino acids) using liquid chromatography with high-resolution tandem mass-spectrometry (HPLC-MS/MS HR). The separation of components was carried out in reverse-phase gradient HPLC mode. Detection for targeted analysis was carried out in the total ion current mode Fourier transform-based mass spectrometry (FTMS) in combination with selective reaction monitoring (SRM); for non-targeted analysis, the FTMS mode was used.

**Results.** The paper presents the results of targeted and untargeted metabolomic studies of blood serum samples from healthy volunteers and patients with a morphologically and clinically confirmed diagnosis of primary immunoglobulin A nephropathy (IgAN). Taking into account data from previous studies, a list of potential biomarkers associated with changes in the intestinal microbiome in conditions of kidney dysfunction was compiled and the prospects for their further research and use in clinical practice were assessed. Significant differences were established in the content of phenyl sulfate, indoleacetic acid, proline, tyrosine and tryptophan in blood serum samples from representatives of the two examined groups. Within the framework of a non-targeted approach, the method of discriminant analysis with projection onto latent structures (PLS-DA) revealed significant differences in the metabolomic profile of the blood serum of patients with an established diagnosis of IgAN and volunteers without this diagnosis.

**Conclusion.** The data obtained indicate the promise of studies of phenyl sulfate, indoleacetic acid, proline, tyrosine and tryptophan in blood serum for the development of approaches to the diagnosis of metabolome disorders in patients with IgAN.

**Key words:** kidney diseases; immunoglobulin A nephropathy; blood serum; uremic toxins; high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; metabolomics study

**For citation:** Savelieva E.I., Alyushina T.I., Shachneva M.D., Dobronravov V.A. Metabolic profiling of blood serum of patients with immunoglobulin A nephropathy using high-performance liquid chromatography - high-resolution tandem mass spectrometry. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (8): 369-376 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-369-376>

**For correspondence:** Savelieva E.I., Dr. Sci. Chem., head of the laboratory of analytical toxicology; e-mail: [savelieva@rihophe.site](mailto:savelieva@rihophe.site)

**Information about authors:**

Savelieva E.I., <https://orcid.org/0000-0002-3115-9626>;  
Alushina T.I., <https://orcid.org/0009-0003-4804-5574>;  
Shachneva M.D., <https://orcid.org/0000-0003-1173-4870>;  
Dobronravov V.N., <https://orcid.org/0000-0002-7179-5520>.

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

**Financing.** This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 23-15-00510).

Received 07.04.2024

Accepted 17.06.2024

Published 01.08.2024

**Введение.** В настоящее время не вызывает сомнений то, что патологические изменения микробиома кишечника могут влиять на развитие и прогрессирование различных болезней, включая патологию почек. Механизмы системных эффектов, вероятно, опосредованы альтерациями интестинального метаболома, изменениями концентраций отдельных метаболитов в циркуляции и их эффектами в отношении почечных и экстраренальных клеточных популяций [1,2].

Связи между микробиотой кишечника и составом метаболитов циркулирующей крови остаются в значительной степени неопределёнными. Иммуноглобулин А нефропатия (IgAN) - наиболее распространённая форма гломерулонефрита и одна из основных причин терминальной почечной недостаточности в мире [3]. Особенностью патогенеза болезни является зависимость поражения почек от активации мукозального иммунитета, который в значительной степени опосредован особенностями их микробиома [4,5]. В этом контексте критичным является определение биомаркёров, которые могут отражать изменения состава кишечной микрофлоры и метаболизма, ассоциированные с тяжестью почечного патологического процесса. Сведения

о биомаркёрах хронических заболеваний почек, ассоциированных с альтерацией кишечного микробиома, остаются противоречивыми, несмотря на ежегодно возрастающее количество проводимых в этой области исследований. Поиски биомаркёров продолжают преимущественно в трёх биоматрицах: в фекалиях, крови, моче [6, 7]. Эффективное применение метаболомики в диагностических целях может быть основано на анализе больших наборов данных с использованием расширяющихся возможностей различных метаболомических платформ [8], нуждающихся в дополнительных валидирующих исследованиях [9,10]. Ненаправленные (или нецелевые) методы метаболомных исследований позволяют одновременно обнаруживать сотни известных соединений, вовлеченных в различные метаболические пути, связанные с патологией почек вообще и с IgAN, в частности [11-14].

Цель исследования - определение потенциальных биомаркёров состояния интестинального метаболома у пациентов с IgAN. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие частные задачи:

- разработка методики определения в сыворотке крови 16-ти потенциальных биомаркёров почечной

дисфункции;

- проведение пилотного эксперимента для предварительной оценки перспективности этих биомаркёров для диагностики альтераций кишечного метаболома при IgAN;

- оценка эффективности выбранного протокола анализа сыворотки крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС ВР) при проведении диагностики.

**Материал и методы.** В качестве объектов исследования использованы образцы сыворотки крови из коллекции НИИ Нефрологии. Всего для анализа использованы 20 образцов сыворотки крови: 10 из них от добровольцев с отсутствием патологии почек, подтверждённым исследованиями мочи и сонографией почек, с нормальными значениями скорости клубочковой фильтрации (группа НС - healthy control) и 10 образцов от пациентов с клинико-морфологически подтверждённым диагнозом IgAN (группа IgAN). Кровь отбирали утром натощак после 12 часов голодания. При анализе в группе IgAN учитывали проводимую фармакотерапию, которая могла включать: лозартан, амлодипин, периндоприл, преднизолон, эналаприл, эзомепразол, омакор, рамиприл, аторвастатин; симвастатин, метоклопрамид, этамзилат, транексамовую кислоту. Лица в группе сравнения лекарственные препараты не принимали. Образцы сыворотки крови взяты из банка длительного хранения и перекодированы, что исключало доступ к персональным данным пациентов. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием лиц, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Выбор аналитов для целевого метаболомного анализа сыворотки крови производили с учётом результатов предыдущих исследований [15-18]. Отобрано 16 потенциальных биомаркёров альтерации кишечного микробиома и оценена перспективность их дальнейшего исследования применительно к IgAN.

Исследовано 16 соединений: 9 из них относились к группе так называемых «уремических токсинов», включая: индолуксусную кислоту, индоксилглюкуронид, индоксилсульфат, триметиламиноксид (ТМАО), биопредшественник ТМАО - холин, фенилацетилглутамин, 3-карбокسي-4-метил-5-пропил-2-фуранпропионат (СМРФ), фенилсульфат, фенилглюкуронид, гиппуровую кислоту.

В сыворотке крови определяли содержание холина и 6 аминокислот - тирозина, фенилаланина, валина, пролина, метионина, триптофана, являющихся биопредшественниками известных биомаркёров альтераций микробиома при дисфункции почек. Все исследованные кандидатные биомаркёры так или иначе ассоциированы с альтерацией кишечного микробиома [8-14].

Не существует единого мнения о диагностической ценности свободных и связанных с белком индолных токсинов. Обычно связывание с белком снижает опасность эндогенных токсинов. Установлено, что факторами риска являются свободные (не связанные с белком) индолные токсины [19], в других работах в качестве информативного показателя рассматривается их общее

содержание в сыворотке или плазме крови [20]. В настоящей работе с использованием метода ультрамикрочисленной фильтрации проведено раздельное определение свободных и связанных с белком индолуксусной кислоты и индоксилсульфата.

В работе использованы следующие реактивы и материалы: метанол (J.T.Baker, Нидерланды); ацетонитрил (Panreac, Испания); муравьиная кислота, ЧДА (Экос-1, Россия); аналитические стандарты уремических токсинов - индолуксусная кислота, индолглюкуронид, индоксил сульфат, триметиламиноксид (ТМАО), фенилацетил глутамин, 3-карбокسي-4-метил-5-пропил-2-фуранпропионат (СМРФ), фенил сульфат, фенил глюкоронид, гиппуровая кислота (Sigma Aldrich, США); холин (Sigma Aldrich, США); аналитические стандарты аминокислот - тирозин, фенилаланин, валин, пролин, метионин, триптофан (Sigma Aldrich, США); центробежный фильтр Amicon Ultra-0.5 с мембраной Ultracel-3k (Sigma Aldrich, США).

Для подготовки проб к анализу использованы: центрифуга MiniSpin plus (Eppendorf, Германия), микроцентрифуга с охлаждением Microfuge 22R (Beckman Coulter, США), шейкер для пробирок Multi Reax (Heidolph, Германия).

Определение уремических токсинов, холина и аминокислот в сыворотке крови проводили на жидкостном хроматографе UltiMate 3000 с масс-селективным детектором Q-Exactive с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении (Thermo Scientific, США) и программным обеспечением для управления и обработки данных «Xcalibur». Хроматографическое разделение компонентов осуществляли на колонке Zorbax SB-C8 длиной 15 см, внутренним диаметром 4.6 мм, с размером частиц 1.8 мкм (Agilent Technologies, США).

Условия хроматографического разделения: скорость потока элюента - 0.4 мл/мин; температура термостата колонки - 35 °С; температура термостата для проб - 5 °С; объем вводимой пробы - 5 мкл; время анализа при определении уремических токсинов, холина и аминокислот - 14 минут; время анализа при нецелевом метаболомном исследовании - 20 минут.

Подвижная фаза:

– компонент А - 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде для ВЭЖХ;

– компонент В - ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ.

Режим элюирования – градиентный (табл. 1).

Условия масс-спектрометрического детектирования: режим источника ионизации - электростатическое распыление при атмосферном давлении; температура капилляра электроспрея - 380 °С; температура проводящего капилляра - 300 °С; скорость потока защитного газа - 50 psi; скорость потока вспомогательного газа - 17 у.ед.; напряжение на капилляре - 3500 В; масс-спектральное разрешение - 30 000; режим сканирования в диапазоне масс от 70 до 1000 *m/z*. Режим детектирования при целевом анализе: регистрация полного ионного тока в режиме высокого разрешения (FTMS) в сочетании с регистрацией селективных реакций (SRM). Полярность детектируемых ионов: детектирование положительных и отрицательных ионов. Параметры идентификации уремических токсинов, холина и аминокислот в сыворотке крови методом ВЭЖХ-МС/МС ВР представлены в табл. 2.

Таблица 1

Соотношение компонентов подвижной фазы в режиме ВЭЖХ анализа

Целевой анализ			Нецелевой анализ		
Время, мин	A, %	B, %	Время, мин	A, %	B, %
0,0	90	10	0,0	90	10
0,5	90	10	0,5	90	10
8	10	90	10	10	90
10	10	90	15	10	90
10,1	90	10	15,1	90	10
14	90	10	20	90	10

Режим детектирования при нецелевом анализе: регистрация полного ионного тока в режиме высокого разрешения. Остальные условия те же, что и в протоколе целевого анализа.

Определение свободных и связанных с белками сыворотки крови соединений проводили согласно процедуре [21] с незначительными модификациями. Для определения свободных аналитов 100 мкл сыворотки переносили в устройство для ультрафильтра-

ции (центробежный фильтр Amicon Ultra-0.5 с мембраной Ultracel-3k) и центрифугировали 15 минут со скоростью 14 тыс об/мин. Для определения общего количества соединений (свободных и связанных с белками крови) к 100 мкл сыворотки крови добавляли 300 мкл метанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 15 минут со скоростью 14 тыс. об/мин и анализировали экстракт методом ВЭЖХ-МС/МС ВР.

Таблица 2

Параметры идентификации уремических токсинов, холина и аминокислот

Аналит	Условия детектирования	Полярность	RT, мин
Индолуксусная кислота	176,0706→130,0649 (SRM)	(+)	6,5
Индолглюкоронид	308,0770→113,0230 (SRM)	(-)	7,8
Индоксил сульфат	212,0023→79,9558 (SRM)	(-)	7,2
ТМАО	76,0757→58,0652 (SRM)	(+)	3,9
Фенилацетил глутамин	265,1180→130,0496 (SRM)	(+)	8,0
СМРФ	239,0925→195,1016 (SRM)	(-)	10,4
Фенил сульфат	172,9914 (FTMS)	(-)	7,8
Фенил глюкоронид	269,0668 (FTMS)	(-)	7,8
Гиппуровая кислота	178,0510 (FTMS)	(-)	8,3
Холин	162,1125 (FTMS)	(-)	3,7
Тирозин	182,0812 (FTMS)	(+)	4,9
Фенилаланин	166,0862 (FTMS)	(+)	7,1
Валин	118,0863 (FTMS)	(+)	4,0
Пролин	116,0706 (FTMS)	(+)	4,0
Метионин	150,05833 (FTMS)	(+)	4,6
Триптофан	205,0971 (FTMS)	(+)	7,6

Примечание. (+) - регистрация положительных ионов; (-) - регистрация отрицательных ионов.

Для приготовления градуировочных растворов уре-мических токсинов и холина использована модельная смесь раствора альбумина в фосфатном буфере, имитирующая сыворотку крови. Для этого приготовлен раствор альбумина в фосфатном буфере с концентрацией 45 мг/мл, в который введена стандартная добавка смеси анализируемых компонентов в соответствующих концентрациях. Пробы проводили по процедуре пробоподготовки и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС ВР. При определении аминокислот для приготовления градуировочных растворов использована деионизированная вода, в которую вносили стандартные растворы различной концентрации. Пробы проводили по процедуре пробоподготовки и анализировали методом

ВЭЖХ-МС/МС ВР.

Нецелевое метаболомное исследование проведено по протоколу [22] с небольшими модификациями. Для этого к аликвоте каждого образца сыворотки объемом 50 мкл добавляли 200 мкл метанола, встряхивали на устройстве Вортекс в течение 10 мин, центрифугировали образцы в течение 10 мин при 14 тыс. об/мин (при 4 °С) и анализировали экстракт методом ВЭЖХ-МС/МС ВР.

Статистическая обработка результатов анализа проведена с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism 9 и Excel, электронного ресурса MetaboAnalyst 5.0. Нормальность распределения определена по методу Колмогорова-Смирнова, статистически значимые различия между двумя группами определены по методу Манна-

Уитни и методом дискриминантного анализа частичных наименьших квадратов (Partial Least Squares Discriminant

Analysis, PLS-DA). Статистически значимыми считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Таблица 3

Характеристики разработанной методики определения уремических токсинов, холина и аминокислот в сыворотке крови

Аналит	ЛД, мкг/мл	R <sup>2</sup> (n=5)	ПО, мкг/мл	КВ, % (n=5)
Холин	0,10-10	0,9998	0,005	3
Триметиламиноксид (ТМАО)	0,10-10	0,9994	0,005	12
Индоксилсульфат	0,01-10	0,9993	0,005	4
Фенилацетилглутамин	0,01-10	0,9975	0,005	8
Гиппуровая кислота	0,10-10	0,9995	0,005	8
Индолюксусная кислота	0,10-10	0,9994	0,005	3
3-карбокси-4-метил-5-пропил-2-фуранпропионат (СМРФ)	0,10-10	0,9981	0,005	2
Индолглюкоронид	0,01-10	0,9999	0,001	8
Фенилглюкоронид	0,01-10	0,9967	0,001	10
Фенил сульфат	0,01-10	0,9999	0,005	9
Тирозин	0,10-10	0,9998	0,01	4
Фенилаланин	0,10-20	0,9999	0,01	4
Валин	0,10-30	0,9999	0,01	8
Пролин	0,10-20	0,9991	0,01	3
Метионин	0,10-10	0,9999	0,01	4
Триптофан	0,10-20	0,9999	0,01	5

Таблица 4

Уремические токсины, холин, аминокислоты в образцах сыворотки крови в экспериментальной (IgAN) и контрольной (НС) группах

Аналит	Концентрация, мкг/мл Me [Q <sub>1</sub> ; Q <sub>3</sub> ]		p
	Группа НС	Группа IgAN	
СМРФ	2,21 [0,89; 2,80]	1,19 [0,74; 2,46]	0,24
ТМАО	0,73 [0,44; 1,07]	0,72 [0,43; 1,91]	0,46
Валин	23,53 [19,08; 27,23]	20,59 [17,67; 22,98]	0,10
Гиппуровая кислота	1,08 [0,60; 1,64]	1,32 [0,66; 2,62]	0,28
Индоксил сульфат (общее количество)	3,63 [2,15; 4,90]	3,13 [1,74; 4,98]	0,45
Индоксил сульфат (свободный)	0,40 [0,25; 0,63]	0,59 [0,33; 1,07]	0,11
Индолюксусная кислота (общее количество)	0,47 [0,35; 0,56]	0,30 [0,24; 0,39]	<b>0,02</b>
Индолюксусная кислота (свободная)	0,12 [0,10; 0,20]	0,15 [0,12; 0,19]	0,31
Карнитин	4,81 [3,88; 5,25]	4,61 [3,95; 5,48]	0,46
Метионин	1,88 [1,39; 2,23]	2,06 [1,87; 2,39]	0,11
Пролин	16,20 [13,65; 17,62]	13,04 [10,80; 15,43]	<b>0,04</b>
Тирозин	6,24 [5,77; 6,96]	5,17 [4,48; 6,61]	<b>0,01</b>
Триптофан	7,88 [7,16; 8,24]	5,90 [5,10; 6,89]	<b>&lt;0,01</b>
Фенилаланин	10,69 [8,69; 12,53]	9,26 [8,08; 10,82]	0,09
Фенилацетил глутамин	0,64 [0,34; 1,06]	1,02 [0,46; 1,55]	0,14
Фенилсульфат	0,26 [0,22; 0,61]	0,66 [0,38; 1,50]	<b>0,01</b>
Холин	2,09 [1,60; 2,49]	1,69 [1,54; 2,10]	0,19

Примечание. Жирным шрифтом выделены значения уровня значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты.** На первом этапе исследования оценены воспроизводимость и правильность результатов измерений, получаемых при использовании разработанной методики. Оценку воспроизводимости количественного определения целевых компонентов осуществляли с помощью образца сыворотки для контроля (QC), который разделяли на 5 аликвот и определяли фоновые концентрации целевых компонентов. Затем в объединённый образец сыворотки крови добавляли аналитические стандарты с известной концентрацией и анализировали. Линейные диапазоны концентраций (ЛД), пределы обнаружения (ПО), и коэффициенты вариации (КВ) представлены в табл. 3. Пределы количественного определения соответствуют нижним границам линейных диапазонов.

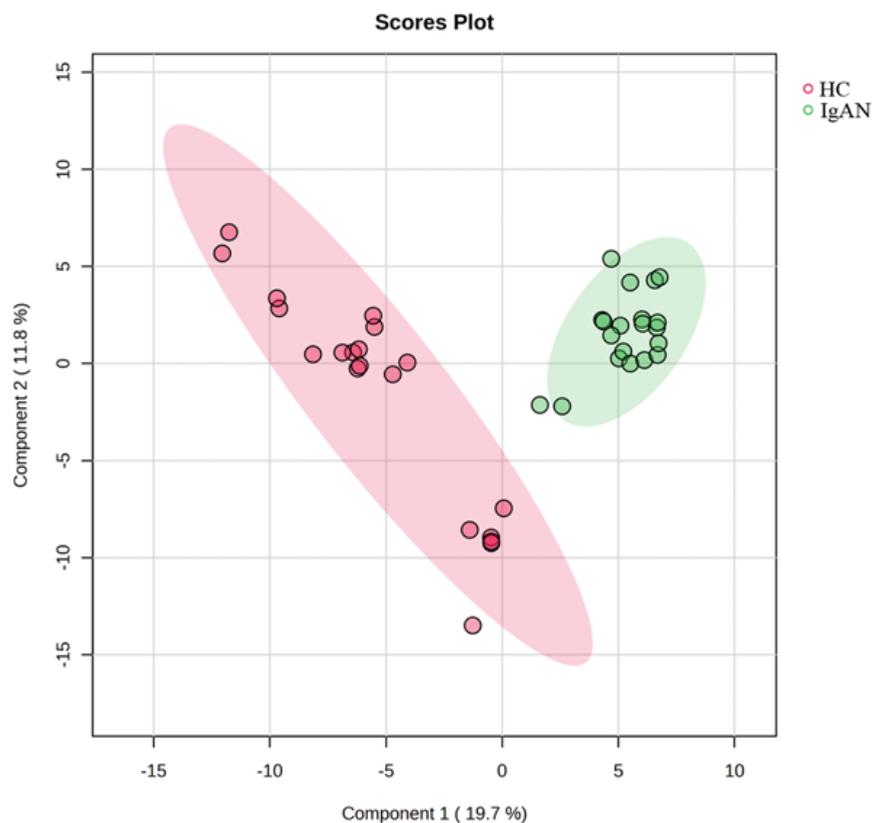
Как следует из табл. 3, разработанная методика обладает удовлетворительными метрологическими характеристиками и может быть применена для выполнения измерений концентраций выбранной группы аналитов в целевом метаболомном исследовании.

Результаты определения уремических токсинов, хо-

лина и аминокислот в образцах сыворотки крови здоровых добровольцев и пациентов с подтвержденным диагнозом IgAN представлены в табл. 4. Результаты представлены как медианное значение (Me) и интерквартильный размах в 25 и 75 перцентилей.

По сравнению с группой контроля в образцах сыворотки крови пациентов с диагнозом IgAN (группа IgAN) наблюдали статистически значимое увеличение концентрации фенолсульфата на 60% ( $p=0,01$ ), снижение концентраций пролина на 20% ( $p=0,04$ ), тирозина на 17% ( $p=0,01$ ), триптофана на 25% ( $p=0,01$ ), общего количества индолуксусной кислоты на 36% ( $p=0,02$ ).

**Оценка информативности ВЭЖХ-МС/МС ВР анализа сыворотки крови для диагностики IgAN.** Для оценки потенциальной информативности выбранного протокола анализа масс-хроматограммы, полученные после анализа образцов сыворотки крови методом ВЭЖХ-МС/МС ВР, обработаны методом дробиных наименьших квадратов (PLS-DA) (см. рисунок).



Различия в метаболомном профиле сыворотки крови добровольцев контрольной (HC) и основной (IgAN) групп.

Как видно из рисунка, методом PLS-DA выявлены достоверные (модель прошла перекрёстную проверку (cross validation) со значениями  $Q^2=0.66$  и  $R^2=0.79$ ) различия в метаболомном профиле сыворотки крови здоровых добровольцев и пациентов с подтверждённым диагнозом IgAN. Можно сделать вывод, что сыворотка крови является информативной биоматрицей для проведения метаболомных исследований в целях диагностики

IgAN. Как следует из рисунка, группа IgAN является более однородной в сравнении с группой контроля.

**Обсуждение.** У пациентов с почечной недостаточностью логично было бы ожидать повышения концентраций всех уремических токсинов в крови. То, что концентрации уремических токсинов в циркулирующей крови напрямую связаны с нарушением функции почек, является консенсусным мнением [23]. В ряду

исследованных в работе уремических токсинов концентрация фенилсульфата значимо (на 60%) повышена у пациентов с диагнозом IgAN. Установлено, что уровни фенилсульфата в циркулирующей крови крыс значительно коррелируют с прогрессированием альбуминурии [24]. В нашем исследовании это подтверждено применительно к пациентам с IgAN. Фенилсульфат может быть не только биомаркером для ранней диагностики, но и модифицируемой причиной и, следовательно, мишенью для лечения патологии почек.

Концентрации триптофана и продуцируемого микробиомом его метаболита индолуксусной кислоты в сыворотке крови пациентов с диагнозом IgAN практически синхронно (на 25-30%) понижены. Концентрации свободной индолуксусной кислоты в сыворотке крови представителей обеих групп практически одинаковы, в то время как общее содержание за счёт связанной с белком формы в группе IgAN понижено. Такой результат представляется неожиданным. Тем не менее, он подтверждается данными масштабного исследования [12], нацеленного на поиск биомаркеров плазмы крови для диагностики IgAN. Наиболее высокие концентрации индолуксусной кислоты зафиксированы не только при IgAN в терминальных стадиях, но и, как это ни парадоксально, у здоровых добровольцев. В стадиях I-II содержание индолуксусной кислоты в крови понижено. Индолуксусная кислота должна быть повышена в сыворотке крови при наличии воспалительных процессов, кардиоваскулярных рисков, при неблагоприятном прогнозе хронических болезней почек [25]. Если эти неблагоприятные эффекты скомпенсированы, уровень индолуксусной кислоты в крови падает [26]. Возможно, более низкий уровень индолуксусной кислоты в сыворотке крови группы IgAN обусловлен приемом фармацевтических препаратов, понижающих содержание липополисахаридов в крови [27]. Определение диагностических биомаркеров IgAN в большинстве случаев будет происходить на фоне сопутствующих заболеваний и фармакотерапии, поэтому биомаркеры, сохраняющие диагностический потенциал независимо от этих обстоятельств, будут иметь особую ценность.

Термин «уремические токсины» является исторически сложившимся, но с учётом современных представлений далеко не все соединения, охватываемые этой группой, следует оценивать именно как токсины. Индолуксусная кислота в последние годы рассматривается с позиций её терапевтического потенциала в отношении различных проявлений дисбиоза кишечника [28]. В этой связи можно предполагать защитные функции индолуксусной кислоты при развитии IgAN, чем может быть обусловлено её пониженное содержание в сыворотке крови группы IgAN в сравнении с контрольной группой. Полученный результат интересен с позиций оценки не только диагностического, но и терапевтического потенциала индолуксусной кислоты. В этой связи важен результат, установивший безусловную связь между индолуксусной кислотой и фактором роста стволовых клеток (SCF), необходимым для выживания, пролиферации и дифференцировки кроветворных стволовых клеток [29].

В ряду исследованных биомаркеров для трёх аминокислот - пролина, тирозина, триптофана, установлено значимое снижение их концентраций в сыворотке крови пациентов с IgAN в сравнении с контролем, что

полностью совпадает с результатами исследования, в котором показано снижение концентраций этих трёх аминокислот при почечной дисфункции [30]. Эти три аминокислоты обнаруживали отрицательную корреляцию с креатинином и мочевиной сыворотки крови. Снижение уровня пролина в сыворотке крови пациентов с почечной дисфункцией установлено впервые, что может быть объяснено снижением реабсорбции пролина в почках. Снижение уровня тирозина в крови при почечной дисфункции отмечалось и ранее, и объяснялось нарушением синтеза тирозина из фенилаланина в почках [31]. Снижение концентрации триптофана в циркулирующей крови пациентов с почечной дисфункцией описано ранее [32], при этом выявлена отрицательная корреляция ( $r=-0,6$ ) между концентрацией триптофана и тяжестью заболевания.

Хотя перечисленные различия между исследуемыми в работе группами являются статистически значимыми, они, все же с учётом малого объёма выборки, остаются сугубо ориентировочными. При переходе от пилотного эксперимента к когортному исследованию такие различия могут и не подтвердиться. В свете полученной информации важно задаться вопросом, насколько выбранный протокол ВЭЖХ-МС/МС ВР анализа сыворотки крови перспективен для диагностики и, возможно, стратегии терапевтического лечения IgAN. Как следует из рисунка, при анализе сыворотки крови методом ВЭЖХ-МС/МС ВР метаболом сыворотки пациентов с IgAN значительно отличается от контроля. Молекулярная верификация этих различий является сложной задачей.

Идентификация и поиск наиболее значимых и характеристичных биомаркеров данного заболевания, определённых по полученным методом PLS-DA данным, будет проводиться на следующем этапе исследования. В рамках пилотного эксперимента задача дифференциальной диагностики этиологии нефропатии не ставилась. Различия в этиологии заболеваний почек основываются на происхождении и точной анатомической позиции процесса заболевания. Ввиду того, что в исследовании использована сыворотка крови пациентов с клинически установленным диагнозом IgAN, мы не сочли возможным распространить полученные результаты на другие формы болезней почек.

**Заключение.** Разработанная в рамках проведённого исследования методика определения 16 потенциальных биомаркеров IgAN в циркулирующей крови успешна валидирована и применена для целевого метаболомного анализа. Результаты ВЭЖХ-МС/МС ВР анализа подтвердили данные литературы о снижении концентраций трёх аминокислот: фенилаланина, тирозина, триптофана у пациентов с IgAN. Из исследованных уремических токсинов индолуксусная кислота и фенилсульфат установлены в качестве биомаркеров-кандидатов, показавших значимые различия в концентрациях в сыворотке крови пациентов с IgAN и контрольной группы. Нецелевой метаболомный ВЭЖХ-МС/МС ВР анализ показал, что сыворотка крови является перспективной биоматрицей для диагностики заболевания и, возможно, оценки тяжести его течения. Первоочередной задачей в этом направлении является подтверждение установленных и поиск новых биомаркеров-кандидатов, их валидация в дальнейших экспериментах.

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 2-9, 11-16, 18-32 СМ.  
REFERENCES)

1. 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): 253-60. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-5-253-260.
10. Дон Е.С., Тарасов А.В., Эпштейн О.И., Тарасов С.А. Биомаркеры в медицине: поиск, выбор, изучение и валидация. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(1): 52-9. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-1-52-59.
17. Гецина М.Л., Черневская Е.А., Белобородова Н.В. Роль обиха для человека и микробиоты метаболитов триптофана при тяжелых заболеваниях и критических состояниях (обзор). *Клиническая практика*. 2020; 11(1): 92-102. DOI: 10.17816/clinpract19068.

REFERENCES

1. 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*. 2023; 68 (5): 253-60. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-5-253-260. (in Russian)
2. Mishima E., Fukuda S., Mukawa C., Yuri A., Kanemitsu Y., Matsumoto Y. Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by a CE-TOFMS-based metabolomics approach. *Kidney Int*. 2017; 92(3): 634-45. DOI: 10.1016/j.kint.2017.02.011
3. Jha V., Garcia-Garcia G., Iseki K., Li Z., Naicker S., Plattner B., Yang C.W. Chronic kidney disease: Global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013; 382: 260-72. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60687-X.
4. Mucha K., Pac M., Paćzek L. Omics are Getting Us Closer to Understanding IgA Nephropathy. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2023; 71(1): DOI: 10.1007/s00005-023-00677-w.
5. Radhakrishnan A., Elango A., Ilanchoorian D. Aging gut microbiota and chronic kidney disease. *Gut Microbiota in Aging and Chronic Diseases*. 2023. 153-73. DOI: 10.1007/978-3-031-14023-5\_8.
6. Lun H., Yang W., Zhao S., Jiang M., Xu M., Liu F., Wang Y. Altered gut microbiota and microbial biomarkers associated with chronic kidney disease. *Microbiology Open*. 2018; 8(4): 00678. DOI: 10.1002/mbo3.678.
7. Mc Carthy D.D., Kujawa J., Wilson C., Papandile A., Poreci U. Mice overexpressing BAFF develop a commensal flora-dependent, IgA-associated nephropathy. *J. Clin. Invest*. 2011; 121: 3991-4002. DOI: 10.1172/JCI45563.
8. Huang Y., Xin W., Xiong J. The intestinal microbiota and metabolites in the gut-kidney-heart axis of chronic kidney disease. *Front Pharmacol*. 2022; 13: 837500. DOI: 10.3389/fphar.2022.837500.
9. Chasapi S. A., Karagkouni E., Kalavrizioti D., Vamvakas S., Zompra A., Takis P. G., Goumenos D. S., Spyroulias G. A. NMR-based metabolomics in differential diagnosis of chronic kidney disease (CKD) subtypes. *Metabolites*. 2022; 12(6): 490. DOI: 10.3390/metabo12060490 S.A.
10. Don E.S., Tarasov A.V., Epstein O.I., Tarasov S.A. Biomarkers in medicine: search, selection, study and validation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2017; 62(1): 52-9. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-1-52-59. (in Russian)
11. Hirakawa Y., Yoshioka K., Kojima K., Yamashita Y., Shibahara T., Wada T., Nangaku M., Inagi R. Potential progression biomarkers of diabetic kidney disease determined using comprehensive machine learning analysis of non-targeted metabolomics. *Sci. Rep*. 2022; 12(1): 16287. DOI: 10.1038/s41598-022-20638-1.
12. Fu X., Luo Z.X., Yin H.H., Liu Y.N., Du X.G., Cheng W., Liu J.Y. Metabolomics study reveals blood biomarkers for early diagnosis of chronic kidney disease and IgA nephropathy: A retrospective cross-sectional study. *Clin. Chim. Acta*. 2024; 555: 117815. DOI: 10.1016/j.cca.2024.117815.
13. Dong L., Tan J., Zhong Z., Tang Y., Qin W. Altered serum metabolic profile in patients with IgA nephropathy. *Clin. Chim. Acta*. 2023; 549: 117561. DOI: 10.1016/j.cca.2023.117561.
14. Davies R. The metabolomic quest for a biomarker in chronic kidney disease. *Clin. Kidney J*. 2018; 11 (5): 694-703. DOI: 10.1093/ckj/sfy037.
15. Toft P.B., Vanslette A.M., Trošt K., Moritz T., Gillum MP, Bäckhed F, Arora T. Microbial metabolite p-cresol inhibits gut hormone expression and regulates small intestinal transit in mice. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2023; 14: 1200391. DOI: 10.3389/fendo.2023.1200391.
16. Zhang D., Jian Y.P., Zhang Y.N. et al. Short-chain fatty acids in diseases. *Cell Commun. Signal*. 2023; 21: 212. DOI: 10.1186/s12964-023-01219-9.
17. Getsina M.L., Chernevskaya E.A., Beloborodova N.V. The role of tryptophan metabolites common to humans and microbiota in severe diseases and critical conditions (review). *Klinicheskaya praktika*. 2020; 11(1): 92-102. DOI: 10.17816/clinpract19068. (in Russian)
18. Mair R.D., Sirich T.L., Plummer N.S., Meyer T.W. Characteristics of colon-derived uremic solutes. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 2018; 13(9): 1398-1404. DOI: 10.2215/CJN.03150318.
19. Liabeuf S., Barreto D.V., Barreto F.C., Meert N., Glorieux G., Schepers E., Temmar M., Choukroun G., Vanholder R., Massy Z.A. Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2010; 25: 1183-91. DOI: 10.1093/ndt/gfp592.
20. Machado T.S., Poitevin S., Paul P., McKay N., Jourde-Chiche N., Legris T. et al. Indoxyl sulfate upregulates liver P-glycoprotein expression and activity through aryl hydrocarbon receptor signaling. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2018; 29: 906-18. DOI: 10.1681/ASN.2017030361.
21. Fabresse N., Uteem I., Lamy E., Massy Z., Larabi I.A., Alvarez J.C. Quantification of free and protein bound uremic toxins in human serum by LC-MS/MS: comparison of rapid equilibrium dialysis and ultrafiltration. *Clin. Chim. Acta*. 2020; 507: 228-35. DOI: 10.1016/j.cca.2020.04.032.
22. Souza A.L., Patti G.J. A Protocol for untargeted m Analysis: From Sample Preparation to Data Processing. *Methods Mol. Biol*. 2021; 2276: 357-82. DOI: 10.1007/978-1-0716-1266-8\_27.
23. Teo S.H., Endre Z.H. Biomarkers in acute kidney injury (AKI). *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol*. 2017; 31: 331-44. DOI: 10.1016/j.bpa.2017.10.003.
24. Kikuchi K., Saigusa D., Kanemitsu Y., Matsumoto Y., Thanai P., Suzuki N. Gut microbiome-derived phenyl sulfate contributes to albuminuria in diabetic kidney disease. *Nat. Commun*. 2019; 10(1):1835. DOI: 10.1038/s41467-019-09735-4.
25. Dou L., Sallée M., Cerini C., Poitevin S., Gondouin B., Jourde-Chiche N. et al. The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2015; 26(4): 876-87. DOI: 10.1681/ASN.2013121283.
26. Liabeuf S., Laville S.M., Glorieux G., Cheddani L., Brazier F., Titeca Beauport D. et al. Difference in profiles of the gut-derived tryptophan metabolite indole acetic acid between transplanted and non-transplanted patients with chronic kidney disease. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21(6): 2031. DOI: 10.3390/ijms21062031.
27. Ji Y., Yin W., Liang Y., Sun L., Yin Y., Zhang W. Anti-inflammatory and anti-oxidative activity of indole-3-acetic acid involves induction of HO-1 and neutralization of free radicals in RAW264.7 cells. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21(5): 1579. DOI: 10.3390/ijms21051579.
28. Chen Y., Pan R., Mei L., Tian P., Wang L., Zhao J., Chen W., Wang G. Colon-Targeted Delivery of Indole Acetic Acid Helps Regulate Gut Motility by Activating the AHR Signaling Pathway. *Nutrients*. 2023; 15: 4282. DOI: 10.3390/nu15194282.
29. Wu P.-H., Lin Y.-T., Wu P.-Y., Lee H.-H., Lee S.-C., Hung S.-C. et al. Association between circulation indole-3-acetic acid levels and stem cell factor in maintenance hemodialysis patients: a cross-sectional study. *Journal of Clinical Medicine*. 2020; 9(1): 124. DOI: 10.3390/jcm9010124.
30. Andrianova N.V., Popkov V.A., Klimenko N.S., Tyakht A.V., Baydakova G.V., Frolova O.Yu. Microbiome-metabolome signature of acute kidney injury. *Metabolites*. 2020; 10(4): 142. DOI: 10.3390/metabo10040142.
31. Kopple J. D. Phenylalanine and Tyrosine Metabolism in Chronic Kidney Failure. *The Journal of Nutrition*. 2007; 137(6): 1586S-1590S. DOI: 10.1093/jn/137.6.1586s.
32. Saito A., Niwa T., Maeda K., Kobayashi K., Yamamoto Y., Ohta K. Tryptophan and indolic tryptophan metabolites in chronic renal failure. *Am. J. Clin. Nutr*. 1980; 33: 1402 DOI: 10.1093/ajcn/33.7.1402.