

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕЧНОЙ ПАРЕНХИМЫ В МОЧЕ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПИЕЛОНЕФРИТОМ МЕТОДАМИ ИФА И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Захарова Н.Б.¹, Пастушкова Л.Х.², Лях Р.В.¹, Понукалин А.Н.¹,
Вараксин Н.А.³, Офицеров В.И.³, Кононихин А.С.⁴, Ларина И.М.²,
Николаев Е.Н.⁴

¹ ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского»
Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

² ФГБУН «ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН», Москва, Россия

³ АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

⁴ ФГБУН «Институт энергетических проблем химической физики имени В.Л. Тальрозе РАН», Москва, Россия

Резюме. Проведено клиническое наблюдение и обследование 22 больных хроническим пиелонефритом (ХПН) и 30 практически здоровых лиц. Больные ХПН обследованы дважды. В первую группу (Г1) вошли пациенты с обострением данного заболевания. В группу сравнения (Г2) – те же больные спустя 1,5–3 месяца после завершения лечения, без клинических проявлений обострения ХПН. У всех обследованных пациентов не выявлены лабораторные признаки острого почечного повреждения. В образцах мочи всех обследованных лиц проводили определение концентрации VEGF, MCP-1, IL-8 и IL-18 в моче методом ИФА. У 6 пациентов Г1 и 6 Г2 с исследовали белковый спектр мочи с помощью масс-спектрометрического анализа, используя хроматограф Agilent 1100 и гибридный масс-спектрометр LTQ-FT Ultra. Результаты параллельного определения белков мочи двумя методами показали, что обострение ХПН развивается на фоне локальной вторичной иммунной недостаточности на уровне уротелия почечных канальцев. Определение протеома мочи с помощью масс-спектрометрии при обострении заболевания позволяет идентифицировать белки, связанные с повреждением эпителиальной выстилки почечных канальцев и формированием локального иммунного ответа.

Ключевые слова: пиелонефрит, цитокины, мочевые биомаркеры, протеомика, масс-спектрометрия

Адрес для переписки:

Захарова Наталья Борисовна
ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский
университет имени В.И. Разумовского» Министерства
здравоохранения РФ
410012, Россия, г. Саратов, ул. Большая Казачья, 112.
Тел.: 8 (909) 336-02-61.
E-mail: lipidgormon@mail.ru

Address for correspondence:

Zakharova Natalia B.
V. Razumovsky Saratov State Medical University
410012, Russian Federation, Saratov,
Bolshaya Kazachya str., 112.
Phone: 7 (909) 336-02-61.
E-mail: lipidgormon@mail.ru

Образец цитирования:

Н.Б. Захарова, Л.Х. Пастушкова, Р.В. Лях,
А.Н. Понукалин, Н.А. Вараксин, В.И. Офицеров,
А.С. Кононихин, И.М. Ларина, Е.Н. Николаев
«Определение биомаркеров повреждения почечной
паренхимы в моче пациентов с хроническим
пиелонефритом методами ИФА и масс-
спектрометрии» // Медицинская иммунология, 2019.
Т. 21, № 2. С. 341-350.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-341-350
© Захарова Н.Б. и соавт., 2019

For citation:

N.B. Zakharova, L.Kh. Pastushkova, R.V. Lyakh,
A.N. Ponukalin, N.A. Varaksin, V.I. Ofitserov,
A.S. Kononikhin, I.M. Larina, E.N. Nikolaev "Renal
parenchymal damage: identification of urinary biomarkers in
the patients with chronic pyelonephritis by means of ELISA and
mass spectrometry techniques", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 2,
pp. 341-350.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-341-350
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-341-350

RENAL PARENCHYMAL DAMAGE: IDENTIFICATION OF URINARY BIOMARKERS IN THE PATIENTS WITH CHRONIC PYELONEPHRITIS BY MEANS OF ELISA AND MASS SPECTROMETRY TECHNIQUES

Zakharova N.B.^a, Pastushkova L.Kh.^b, Lyakh R.V.^a, Ponukalin A.N.^a,
Varaksin N.A.^c, Ofitserov V.I.^c, Kononikhin A.S.^d, Larina I.M.^b,
Nikolaev E.N.^d

^a Saratov State V. Razumovsky Medical University, Saratov, Russian Federation

^b Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^c JSC "Vector-Best", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

^d V. Talrose Institute of Energy Problems in Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. We performed clinical observations and laboratory examination of 22 patients with chronic pyelonephritis (chronic renal failure, CRF) and 30 healthy individuals. The patients with CRF were examined twice. The first group (Group I) included patients with exacerbation of the disease. The comparison series (Group II) was represented by the same patients who were examined 1.5-3 months after completion of treatment, without clinical exacerbation of chronic pyelonephritis (CPN). Laboratory signs of acute renal damage were not detectable in all the patients examined. Concentrations of VEGF, MCP-1, IL-8 and IL-18 were determined in urine samples of all examined persons by ELISA technique. Protein spectrum of urine was assessed in six patients from Group I, and in six cases of Group II by means of mass spectrometry, using Agilent 1100 chromatographic device, and LTQ-FT Ultra hybrid mass spectrometer. The results of parallel determination of urine proteins by the two methods have shown that the evolving CPN exacerbation is associated with local secondary immune deficiency at the level of renal tubular urothelium. Determination of urine proteome by means of mass spectrometry in exacerbating disease allows identify the proteins associated with damage to epithelial lining of renal tubules and development of local immune response.

Keywords: pyelonephritis, cytokines, urinary biomarkers, proteomics, mass spectrometry

Экспериментальные данные, используемые в работе, были получены в рамках программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. (тема №AAAA-A18-118112090111-4).

Введение

Пиелонефрит (ПН) — одно из наиболее распространенных инфекционных заболеваний почек и мочевыводящих путей человека [2, 12, 42]. Основой заболевания считается нарушение локальной иммунной защиты эпителия канальцев почек при ПН, за счет атаки возбудителями инфекции теряет свои структурно-функциональные свойства и перестает участвовать в локальной иммунной защите [13, 18, 27]. Показано, что в острый период заболевания грамотрицательная флора, кишечная палочка и протей могут продвигаться по эпителию канальцев почек вверх против тока мочи, снижая активность фагоцитоза и выделяя эндотоксины, приводя к трансформации структурно-функциональные свойства уротелия [4, 6, 8, 11, 12]. Поврежденный при кон-

такте с бактериальной флорой уротелий теряет барьерные свойства, что приводит к инфильтрации нейтрофилами и моноцитами интерстиция почечной паренхимы [1, 5, 7, 9, 15, 41] и развитию тубулоинтерстициального воспаления с образованием воспалительных инфильтратов. Данные процессы сопровождаются подъемом экскреции с мочой провоспалительных цитокинов и их рецепторов, хемокинов, острофазных белков, характеризующих тяжесть воспалительных изменений паренхимы почек [7, 9, 15, 17, 20, 21, 36]. Повреждение тубулоинтерстициальной ткани почек при ПН сопровождается развитием тканевой гипоксии — основного индуктора синтеза фактора роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF) подоцитами клубочков и клетками канальцев почки, стимулирующего пролиферацию мезангиоцитов и гиперпродукцию мезангиального матрикса, приводящую к развитию нефросклероза [8, 14, 19].

В работе, проведенной ранее, показано, что результаты анализа вышеприведенных медиаторов иммунитета перспективны для оценки струк-

турно-функциональных изменений паренхимы почки могут быть успешно использованы в качестве показателей активности воспалительного процесса и фиброзной трансформации ткани почек при пиелонефритах [7]. Отмечено также, что их концентрация в моче пациентов имеет большую диагностическую значимость, чем в сыворотке крови.

Для выявления и количественного определения этих биомаркеров в моче в настоящее время применяют методы иммунохимического анализа с использованием моноклональных антител к их антигенным детерминантам и выявлении их комплексов с помощью ферментных, флуоресцентных и хемилюминесцентных меток (ИФА и ИХЛА) [3, 6, 8, 14, 16]. Об актуальности таких исследований свидетельствуют появившиеся за последние годы клинические рекомендации по диагностике, классификации и оценке тяжести хронических заболеваний почек, клинике и диагностике острого почечного повреждения [8, 10, 11, 19, 35, 37, 50].

Для поиска новых биомаркеров, характеризующих состояния клеток почек, применяется масс-спектрометрия, позволяющая идентифицировать в клинических образцах ряд низкомолекулярных белков в ничтожно малых концентрациях. Процедура так называемого панорамного анализа протеома мочи человека строится на стандартном подходе, состоящем: из отбора пробы; очистки, концентрирования и предварительном разделении смеси белков; энзиматического расщепления белков с получением смеси пептидов; хромато-масс-спектрометрического анализа смеси пептидов; поиска и идентификации белков с использованием международных баз данных. Считается, что выявление диагностически значимых составляющих протеинов белкового спектра мочи в ближайшем десятилетии позволит получить целый ряд новых биомаркеров, позволяющих внести существенный вклад в исследование ранних, доклинических стадий заболеваний почек и развитие персонализированных методов лечения. Моча — максимально доступный и почти идеальный клинический образец как для клинических, так и для фундаментальных исследований, содержащий информацию не только о почке и мочевом тракте, но и о состоянии других органов [4]. Она может быть получена неинвазивным методом в любых объемах. В настоящее время в образцах мочи человека выделено около 3500 различных белков [38, 44].

Цель исследования — выявление в моче пациентов с хроническим пиелонефритом низкомолекулярных белков, которые характерны для обострения данного заболевания и могут определяться методами ИФА и масс-спектрометрии.

Материалы и методы

Проведено клиническое наблюдение и обследование 52 человек. В первую группу (Г1) вошли 22 пациентов с обострением ХПН без лабораторных признаков нарушения функции почек, находившихся на амбулаторном лечении в ГУЗ СО «Саратовская городская поликлиника № 9». Среди обследованных были пациенты с характерными клиническими проявлениями заболевания, без сопутствующих воспалительных заболеваний и вредных привычек. Критерием включения в Г1 было наличие у пациентов обострения хронического ПН, подтвержденного анамнестическими данными, наличием характерной клинической картины, подтвержденной инструментальными и лабораторными исследованиями (ультразвуковое исследование мочевого пузыря, общеклинические анализы крови и мочи, бактериологическое исследование мочи). В исследование не включали пациентов с врожденным гидронефрозом, стриктурами мочеточника или лоханочно-мочеточникового сегмента, с выраженной сопутствующей общесоматической патологией (сахарный диабет, онкологические заболевания, ИБС, артериальная гипертензия 3-4 стадии, нарушения почечной гемодинамики), с перенесенными ранее хирургическими вмешательствами на почках. Группу сравнения (Г2) составили пациенты группы Г1 через 1,5-3 месяца после завершения лечения, без клинических проявлений обострения хронического ПН, находящиеся на этапе амбулаторного поликлинического обследования. В контрольную группу (КГ) вошли 30 практически здоровых лиц. Средний возраст пациентов с хроническим ПН (Г1 и Г2) составил 67,8 лет, лиц КГ — 53,3 года. Обследование больных ХПН согласно клиническим рекомендациям включало: обзорную рентгенографию и ультразвуковое исследование почек и мочевых путей, общеклинические анализы крови и мочи, определение сКр (креатинин сыворотки крови) и оценки СКФ (скорость клубочковой фильтрации — с помощью расчетного уравнения СКД-EPI 2009). У всех обследованных пациентов не выявлены лабораторные признаки острого почечного повреждения [19].

Для исследований методом ИФА первую порцию утренней мочи, объемом не менее 10 мл, собирали в специальные стаканы с крышками. Предварительно в емкость для забора мочи вносили 20 мкл раствора ProClin 300 (Supelco, США), который позволяет предотвратить протеолиз биомаркеров в моче, контаминированной микроорганизмами [4]. Аликвоты мочи разливали в пробирки с крышками типа Eppendorf объемом 2 мл и хранили до проведения исследования при температуре -25 °С. Концентрацию VEGF,

моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), интерлейкинов-8 и -18 (IL-8 и IL-18) в моче пациентов определяли с помощью соответствующих наборов реагентов АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) для ИФА.

Сбор мочи у 6 пациентов групп П1 и П2 для хромато-масс-спектрометрического анализа проводили согласно стандартному протоколу [4]. В соответствии с этим протоколом для протеомного анализа мочи использовалась средняя порция второй утренней фракции (предпочтительно) или любая утренняя фракция, которая является наименее вариабельной по белковой композиции, вследствие этого — наиболее пригодной для исследований. Несмотря на малое содержание протеаз в моче, способных изменить белковую композицию образцов при их хранении, для изучения белкового состава начинали предварительную пробоподготовку не позднее чем через 20 минут после отделения фракции мочи. Каждый образец центрифугировали 10 минут при 4 °C, 2000 g для удаления загрязнений в виде крупных мертвых клеток, их фрагментов, отбирали надосадочную фракцию, которую замораживали при температуре -80 °C для длительного хранения. В дальнейшем замороженные образцы размораживали при комнатной температуре и центрифугировали повторно 10 минут при 4 °C, 2000 g.

Основные этапы подготовки образцов для протеомного анализа состояли из следующих этапов: 1) концентрирование образцов (надосадочную жидкость) центрифугированием с использованием пробирок с фильтрами AmiconUltra Ultracel-15 3k при 2000 g, 50 минут, +4 °C, до 20-ти кратного уменьшения объема; 2) высушивание образцов в вакуумном концентраторе при +30 °C; 3) восстановление (перерастворение осадка в буфере для восстановления — 0,2 M Tris основной (pH 8,5), 2,5 mM EDTA, 6M Guanidine-HCl, добавление ДТТ — 15 минут при 70 °C) и алкилирование (добавление йодацетата натрия — 30 минут при комнатной температуре в темноте) выделенной белковой фракции для денатурации белков, разрыва S-S мостиков и предотвращения обратного образования дисульфидных связей; 4) осаждение белков ацетоном с 0,1% ТФУ при -20 °C 8-19 часов и получение сухого белкового осадка (при последовательной промывке три раза этанолом с перерастворением осадка, полученного центрифугированием при 2000 g, 10 минут, +4 °C); 5) трипсинолиз — протеолиз с помощью трипсина, для чего образец растворяли в АВВ ((NH₄)₂HCO₃) буфере (pH 8,0) до конечной концентрации 1 мг/мл белка, определенной методом по Бредфорду (Bio-Rad) и добавляли трипсин

1:60 по массовым частям к белку и инкубировали при 37 °C 8-12 часов.

Анализ образцов проводили на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, США) и гибридного масс-спектрометра LTQ-FT Ultra (Thermo, Бремен, Германия) — масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса, совмещенный с линейной квадрупольной ионной ловушкой, использующейся для накопления ионов и измерения спектров индуцированной фрагментации (МС/МС) ионов. Для хроматографии использовали колонку с обращенной фазой ReproSil-Pur C18 (диаметр частиц 3 мкм, диаметр пор 100 Å, Dr. Maisch GmbH, Аммербух-Энтринген, Германия), изготовленную с использованием капилляра-эммитера (Pico-tip, New Objective Inc., США).

Масс-спектрометрический анализ фракций пептидов осуществлялся при помощи программы Xcalibur (Thermo Electron, Бремен, Германия) в 2-стадийном режиме автоматического измерения спектров. В качестве подвижной фазы использовались — растворитель А: H₂O-HCOOH (1000:1, по объему), растворитель В: CH₃CN-HCOOH (1000:1, по объему). Выполнялась градиентная хроматография с линейным увеличением относительного содержания растворителя В в потоке от 5 до 50% за 90 минут, после каждого эксперимента система промывалась 95% ацетонитрилом в течение 15 минут, а затем 100% растворителем А еще 5 минут. Измерение масс-спектров продуктов хроматографического разделения производилось в диапазоне от 300 до 1600 m/z.

Список из точных масс пептидов и масс их фрагментов использовали для поиска и идентификации белков по базе данных IPI-human (международные индексы белков, International protein indices) (version 3.65; 86379 sequences; 34740770 residues) при помощи программы Mascot (Matrix Science, Лондон, Великобритания; version 2.0.04). Дальнейшему анализу подвергались только белки, которые идентифицировались минимум по 2 пептидным фрагментам, причем один из них должен был быть уникальным для данного белка. При проведении анализа для каждого образца выполняли не менее трех технических повторов. Идентификация в поисковой машине Mascot основана на алгоритме MOWSE. Первым этапом поиска является сравнение измеренных масс продуктов МС-МС пептидов для всех записей последовательностей в базе данных с теоретическими масс-спектрами фрагментации. В итоге по степени совпадения определяли MascotScore, являющийся индексом достоверности того, что детектируемым пептидам соответствует определенный белок из конкретной базы данных. Score

всех обнаруженных пептидов (конкретного белка) суммировали, откуда вычисляли суммарный Score для белка. Основные параметры для Mascot поиска были следующие: 1) enzyme — trypsin; 2) peptidtolerance ± 5 ppm; 3) MS/MS (fragments) tolerance $\pm 0,5$ Да.

В списке белков, полученном в результате Mascot-поиска, достоверными считались только те белки, для которых были идентифицированы 2 и более триптических пептида с рейтингом (Score) более 24. Для определения места образования функции выявленных белков, а также для анализа биологических процессов организма, в которых участвуют обнаруженные в моче белки, использовались биоинформационные ресурсы по аннотации генов (Gene Ontology — GO). Частота встречаемости белка в группе пациентов оценивалась на основании полуколичественного сравнительного анализа интегральной интенсивностей триптических пептидов данного белка в хромато-масс-спектрометрическом эксперименте с использованием безметочного подхода (label-free) [4]. Для статистического анализа и определения молекулярных функций и биологических процессов, в которых участвуют белки, использовался программный пакет Perseus. В результате был получен список белков, обнаруживаемых в моче, с указанием числа пептидов, по которым они были идентифицированы, а также параметры достоверности идентификации. Основная часть информации о полученных белках была экстрагирована из баз данных UniProt (<http://www.uniprot.org>).

Для поиска потенциальных биомаркеров обострения ПН анализировали белки, содержащиеся в образцах мочи пациентов в периоде обостре-

ния (ГІ) и при переходе в хроническую форму заболевания (ГІІ).

Различия в клинических данных и клинические переменные сравнивали с помощью ранговых корреляций Спирмена и t-критерия. Разницу частоты встречаемости белка между двумя группами пациентов оценивали с помощью непараметрического теста Краскела—Уоллиса, проведенного в программе MultiExperiment Viewer (p-value меньше или равно 0,05). Данные представляли в виде медианы (Me), 25-го и 75-го процентилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$).

Результаты

При исследовании в период обострения ХПН было показано, что концентрация IL-8, VEGF, MCP-1, и IL-18 в моче больных в 5,4; 3,1; 1,7 и 1,5 раза выше ($p < 0,05$) чем соответствующие значения этих цитокинов в группе условно здоровых лиц (табл. 1). Это, очевидно, связано с тем, что уротелиальные клетки канальцев под воздействием бактериальных агентов начинают синтезировать провоспалительные цитокины и хемокины, инициируя процесс поступления в интерстиций нейтрофилов и моноцитов, играющих значимую роль в повреждении почек [5, 20]. Активация этих эффекторных клеток приводит к дальнейшему повышению продукции и экскреции с мочой MCP-1, VEGF, IL-8, IL-18.

При исследовании образцов мочи пациентов с ХПН (группа ГІІ), проведенном через 1,5–3 месяца после завершения их лечения, было отмечено снижение концентрации каждого из этих биомаркеров, однако уровни IL-8, VEGF, MCP-1 при этом статистически значимо превышали соответствующие показатели для лиц контрольной

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОКИНОВ В МОЧЕ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПИЕЛОНЕФРИТОМ, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

TABLE 1. RESULTS OF CYTOKINE DETERMINATION IN URINE OF PATIENTS WITH CHRONIC PYELONEPHRITIS, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Группа обследованных пациентов Group surveyed	Концентрация исследуемых биомаркеров в моче пациентов, пг/мл Concentration of the studied biomarkers in the urine of patients, pg/ml			
	MCP-1	VEGF	IL-8	IL-18
ГІ Group I n = 22	429,5* (363,9-452,5)	101,6* (65,6-180,15)	34,3* (21,4-71,9)	49,5* (47,1-61,3)
ГІІ Group II n = 22	306,5* (256,1-388,1)	65,3* (36,2-86,4)	18,7* (13,7-45,4)	39,3 (36,5-42,2)
КГ Control group n = 30	252,2 (156,2-287,6)	33,0 (19,0-40,8)	6,4 (4,6-16,3)	32,3 (24,1-38,9)

Примечание. * – $p < 0,05$ в сравнении с КГ.

Note. *, $p < 0.05$ compared to control group.

ТАБЛИЦА 2. СПИСОК БЕЛКОВ, ДЕМОНИСТРИРУЮЩИХ СТАТИСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ РАЗЛИЧИЯ ПРИ СРАВНЕНИИ БОЛЬНЫХ ГП И ГІ

TABLE 2. LIST OF PROTEINS DEMONSTRATING STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCES IN COMPARISON OF PATIENTS GROUPS ГП AND ГІ

Белок (Proteins)	P value
ENOA-HUMAN	0,005708122
KV201-HUMAN	0,017941503
GP2-HUMAN	0,01861632
BGAL-HUMAN	0,02458857
K1C27-HUMAN	0,02458857
KI13B-HUMAN	0,02458857
KV113-HUMAN	0,037242543
S10A9-HUMAN	0,037242543
RS27A-HUMAN	0,039351836
GRM1A-HUMAN	0,047624078

группы. Это может быть связано с тем, что у больных ХПН не произошло санации всех вовлеченных в воспалительный процесс клеток уротелия и почечного интерстиция, вероятно, из-за способности возбудителей инфекции «ускользать» от контроля иммунной системы. Повышенная экскреция MCP-1 с мочой свидетельствует о формировании инфильтратов в почечной паренхиме, ремоделировании почечного кровотока и развитии тканевой гипоксии, стимулирующей синтез VEGF. Сохранение высокой концентрации провоспалительного цитокина IL-8 и VEGF может быть также связано с включением в воспалительный процесс экстрацеллюлярного матрикса, усилением фиброгенеза, разрушением базальной мембраны канальцев и эпителиально-мезенхимальной трансформацией клеток уротелия [12].

Проведенный одновременно масс-спектрометрический анализ мочи подтвердил, что вместе с цитокинами и факторами роста у больных хроническим ПН в стадии обострения появляются специфические белки.

У пациентов ГП в моче определен 661 протеин. В образцах мочи пациентов с хроническим ПН в стадии обострения было идентифицировано 533 белка. Сравнение протеомных профилей мочи больных ГП и ГІ выявило достоверное различие белковых спектров. Период обострения и переход в хроническую форму ПН отличался статистически значимыми различиями ($p < 0,05$) для 10 белков в моче по частоте встречаемости. Среди них: 1 — альфа-енолаза [29]; 2 — KV201_HUMAN — переменная иммуноглобулина каппа 2D-40 [46, 49]; 3 — панкреатический секреторный гранулярный мембранный основной гликопротеин GP2 [47]; 4 — β -галактозидаза BGAL- [30,

32]; 5 — кератин I типа цитоскелета 27 [28]; 6-кинезин-подобный белок KIF13B [22]; 7 — KV113_HUMAN-иммуноглобулин каппа, переменная 1-13 (***) [26, 28, 33, 49]; 8 — белок S100-A9 [45]; 9 — рибосомальный убиквитин — 40S S27a [23]; 10 — GRAM-содержащий белок 1A (***) [44] (табл. 2).

Поиск информации по выявленным белкам, выполненный по открытым базам данных, показал, что пять из них связаны с процессами повреждения и последующей трансформацией метаболических и функциональных свойств клеток уротелия. α -енолаза обнаруживается почти во всех сегментах нефрона, особенно дистальных и собирательных канальцах [29, 43]. GP2-HUMAN относится к панкреатическим секреторным гранулярным мембранным основным гликопротеинам [47]. Нарастание экскреции с мочой BGAL-HUMAN — β -галактозидазы имеет место при введении повреждению почечной ткани нефротоксическими агентами [39]. K1C27-HUMAN-кератин I типа 27 нарастает при ремоделировании тканевых структур [28]; RS27A-HUMAN — рибосомальный белок убиквитин-40S S27a характеризует степень тубулоинтерстициального и клубочкового повреждения, приводящего к почечной недостаточности и гибели животных [40].

К участникам воспалительного процесса и нарушения локальной иммунной защиты уротелия канальцев почек могут быть отнесены еще пять выделенных белков: переменная иммуноглобулина каппа, 2D-40 [46], кинезин-подобный белок KIF13B [22], белок S100-A9 [48], иммуноглобулин каппа переменная 1-13 [24, 31, 33, 34], GRAM-содержащий белок 1A [44].

Все специфические белки, обнаруженные в моче у больных при обострении хронического ПН, можно считать биомаркерами деструктивных изменений стенок канальцев. В начальных стадиях заболевания повреждение структурно-функциональных свойств уроэпителиоцитов способствует развитию микробно-воспалительного процесса на уровне эпителиальной выстилки почечных канальцев. На стадии обострения хронического ПН они, по-видимому, становятся одной из характеристик нарушения структурно-функциональных свойств канальцевого эпителия почек.

Их различная присутствие в образцах больных хроническим ПН в период обострения заболевания и вне него позволяет рассматривать данные белки как потенциальные биомаркеры, которые могут быть полезны в непрерывном мониторинге состояния эпителиальной выстилки почечных канальцев и контроля степени нарушения механизмов иммунной защиты почечной паренхимы.

Вероятно, что дальнейшие исследования с целью определения чувствительности и специфичности белков α -енолаза, GP2-HUMAN; BGAL-HUMAN; K1C27-HUMAN-кератин I типа 27, RS27A-HUMAN) в оценке степени повреждения паренхимы почек, проведенные на большой выборке пациентов с заболеваниями почек, позволят выделить из этой группы наиболее перспективные новые биомаркеры. Для их исследования, очевидно, могут быть созданы более доступные для лабораторной диагностики методы ИФА или ИХЛА.

Выводы

1. Определение концентрации MPC-1, IL-8, VEGF и IL-18 в моче с помощью ИФА — доступ-

ным неинвазивным методом исследования, позволяющий оценить выраженность воспалительного процесса, тяжесть поражения почечной паренхимы у пациентов с хроническим пиелонефритом в период обострения заболевания и после проведенного лечения.

2. В результате масс-спектрометрического анализа образцов мочи больных ХПН выявлены пять белков, частота встречаемости которых значительно возрастает при обострении заболевания. При проведении дополнительных исследований эти белки, возможно, могут стать новыми биомаркерами повреждения и трансформации метаболических и функциональных свойств клеток уротелия у пациентов с заболеваниями почек.

Список литературы / References

1. Алексеев А.В., Гильманов А.Ж., Гатиятуллина Р.С., Ракипов И.Г. Современные биомаркеры острого повреждения почек // Вестник Татарстана, 2014. Т. 7, № 583. С. 22-27. [Alekseev A.V., Gilmanov A.Zh., Gatiyatullina R.S., Rakipov I.G. Modern biomarkers of sharp injury of kidneys. *Vestnik Tatarstana = Bulletin of Tatarstan*, 2014, Vol. 7, no. 583, pp. 22-27. (In Russ.)]
2. Аполихин О.И., Сивков А.В., Москалева Н.Г., Солнцева Т.В., Комарова В.А. Анализ уронефрологической заболеваемости и смертности в Российской Федерации за десятилетний период (2002-2012 гг.) по данным официальной статистики // Экспериментальная и клиническая урология, 2014. № 2. С. 3-12. [Apolikhin O.I., Sivkov A.V., Moskaleva N.G., Solntseva N.V., Komarova V.A. Analysis of the uronephrological morbidity and mortality in the Russian Federation during the 10-year period (2002-2012) according to the official statistics. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya urologiya = Experimental and Clinical Urology*, 2014, no. 2, pp. 3-12. (In Russ.)]
3. Белохвостикова Т.С., Орлова Г.М., Фатахова О.А., Шеметова В.Г., Благовещенская Н.В., Козина О.А. Липокаин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов, у больных с хронической болезнью почек: клинико-лабораторные взаимосвязи // Нефрология и диализ, 2011. Т. 13, № 3. С. 268-269. [Belokhvostikova T.S., Orlova G.M., Fatahova O.A., Shemetova V., Blagoveshchenskaya N.B., Kozina O.A. Lipocalin associated with neutrophil gelatinase in patients with chronic kidney disease: clinical and laboratory relationships. *Nefrologiya i dializ = Nephrology and Dialysis*, 2011, Vol. 13, no. 3, pp. 268-269. (In Russ.)]
4. Вараксин Н.А., Захарова Н.Б., Понукалин А.Н., Россоловский А.Н., Рябичева Т.Г., Офицеров В.И. Цитокины и С-реактивный белок при первичном пиелонефрите: сравнение диагностической значимости концентрации в моче и сыворотке крови // Новости «Вектор-Бест», 2012. Т. 2, № 64. С. 3-9. [Varaksin N.A., Zakharova N.B., Ponukalin A.N., Rossolovsky A.N., Ryabicheva T.G., Ofitserov V.I. Cytokines and C-reactive protein at primary pyelonephritis: comparison of the diagnostic importance of concentration in urine and serum of blood. *Novosti "Vektor-Best" = News of "Vektor-Best"*, 2012, Vol. 2, no. 64, pp. 3-9. (In Russ.)]
5. Вельков В.В., Резникова О.И. Новые возможности для лабораторной диагностики хронической и острой ренальной дисфункции // Научно-практический журнал «Клинико-лабораторный консилиум», 2011. № 3. С. 26-30. [Velkov V.V., Reznikova O.I. New opportunities for laboratory diagnosis of chronic and sharp renalny dysfunction. *Nauchno-prakticheskiy zhurnal "Kliniko-laboratornyy konsilium" = Scientific and Practical Journal "Clinical Laboratory Consultation"*, 2011, no. 3, pp. 26-30. (In Russ.)]
6. Глыбочко П.В., Захарова Н.Б., Понукалин А.Н., Гражданов Р.А., Россоловский А.Н., Вараксин Н.А., Полозов А.Б. Диагностическое значение подъема уровня провоспалительных цитокинов в моче при обострении хронического калькулезного пиелонефрита // Саратовский научно-медицинский журнал, 2011. Т. 7, № 2. прил. С. 143. [Glybochko P.V., Zakharova N.B., Ponukalin A.N., Grazhdanov R.A., Rossolovsky A.N., Varaksin N.A., Polozov A.B. Diagnostic value of rise in level of pro-inflammatory tsitokin in urine at an exacerbation of chronic kalkulezny pyelonephritis. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*, 2011, Vol. 7, no. 2, Suppl., p. 143. (In Russ.)]
7. Добронравов В.А. Обзор патофизиологии острого повреждения почек // В: Смирнов А.В., Добронравов В.А., Румянцев А.Ш., Каюков И.Г. Острое повреждение почек. М.: МИА, 2015. С. 30-79. [Dobronravov V.A. Overview of the pathophysiology of acute kidney injury. In: Smirnov A.V., Dobronravov V.A., Rumyantsev A.Sh., Kayukov I.G. Acute kidney injury]. Moscow: Medical Information Agency, 2015, pp. 30-79.
8. Захарова Н.Б., Долгов А.Б., Иноземцева Н.Д., Блюмберг Б.И. Биомаркеры инфекционно-воспалительных заболеваний почек и мочевыводящих путей // Справочник заведующего КДЛ, 2013. № 2. С. 48-59. [Zakharova N.B., Dolgov A.B., Inozemtseva N.D., Blyumberg B.I. Biomarkers infectious – inflammatory diseases

of kidneys and urinary tract. *Spravochnik zaveduyushchego KDL = Reference Book of the Head of Clinical Diagnostic Laboratory*, 2013, no. 2, pp. 48-59. (In Russ.)]

9. Захарова Н.Б., Пастушкова Л.Х., Ларина И.М., Каширина Д.Н., Лях Р.В., Попков В.М. Значение протеомного состава мочи при заболеваниях мочевыводящих путей (обзор литературы) // Экспериментальная и клиническая урология, 2017. № 1. С. 22-26. [Zakharova N.B., Pastushkova L.Kh., Larina I.M., Kashirina D.N., Lyakh R.V., Popkov V.M. The value of the proteomic composition of the urine in diseases of the urinary tract (review of literature). *Eksperimentalnaya i klinicheskaya urologiya = Experimental and Clinical Urology*, 2017, no. 1, pp. 22-26. (In Russ.)]

10. Земченков А.Ю., Томила Н.А. «К/ДОКИ» обращается к истокам хронической почечной недостаточности (О новом разделе Рекомендаций К/ДОКИ по диагностике, классификации и оценке тяжести хронических заболеваний почек) // Нефрология и диализ, 2004. Т. 6, № 3. С. 204-220. [Semchenkov A.Yu., Tomilina N.A. "DOQI" refers to the origins of chronic renal failure (On a new tab of the recommendations of K/DOQI for the diagnosis, classification and assessment of severity of chronic kidney disease). *Nefrologiya i dializ = Nephrology and Dialysis*, 2004, Vol. 6, no. 3, pp. 204-220. (In Russ.)]

11. Крайдашенко О.В., Долиная М.А. Роль биомаркеров в оценке характера повреждений почек у больных с гипертонической болезнью // Клиническая нефрология, 2014. № 3. С. 23-25. [Kraydashenko O.V., Valley M.A. Rol of biomarkers in an assessment of nature of injuries of kidneys at patients with a hypertensive illness. *Klinicheskaya nefrologiya = Clinical Nephrology*, 2014, no. 3, pp. 23-25. (In Russ.)]

12. Морозов Д.А., Морозова О.Л., Захарова Н.Б., Лакомова Д.Ю. Патогенетические основы и современные проблемы диагностики хронического обструктивного пиелонефрита у детей // Урология, 2013. № 2. С. 129-134. [Morozov D.A., Morozova O.L., Zakharova N.B., Lakomova D.Yu. Pathogenetic bases and modern problems of diagnosis of chronic obstructive pyelonephritis at children. *Urologiya = Urology*, 2013, no. 2, pp. 129-134. (In Russ.)]

13. Новоселова О.В., Волынчик Е.П., Кононова С.В., Вельков В.В., Михайлов Ю.В. Клиническое значение качественного и количественного анализа белкового состава мочи // Лаборатория, 2006. № 1. С. 7-9. [Novoselova O.V., Volynchik E.P., Kononova S.V., Velkov V.V., Mikhaylov Yu.V. Clinical value of the qualitative and quantitative analysis of proteinaceous composition of urine. *Laboratoriya = Laboratory*, 2006, no. 1, pp. 7-9. (In Russ.)]

14. Попков В.М., Долгов А.Б., Захарова Н.Б., Понукалин А.Н., Вараксин Н.А. Мочевые биомаркеры при остром пиелонефрите // Саратовский научно-медицинский журнал, 2013. Т. 9, № 1. С. 110-115. [Popkov V.M., Dolgov A.B., Zakharova N.B., Ponukalin A.N., Varaksin N.A. Uric biomarkers at sharp pyelonephritis. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*, 2013, Vol. 9, no. 1, pp. 110-115. (In Russ.)]

15. Пролетов Я.Ю., Саганова Е.С., Галкина О.В. Роль некоторых биомаркеров в оценке характера хронического повреждения почек у пациентов с первичными гломерулопатиями // Нефрология, 2013. № 1. С. 60-69. [Proletov Ya.Yu., Saganova E.S., Galkina O.V. [Proletov Ya. Yu., Saganova E. S., Galkina O. V. The role of several biomarkers in estimation of kidney injury in patients with primary glomerulopathies. *Nefrologiya = Nephrology*, 2013, no. 1, pp. 60-69. (In Russ.)]

16. Ребров А.П., Захарова Н.Б., Оксеньчук А.Н., Кароли О.Г., Патрикеева Д.А., Попыхова Э.Б. Диагностическое значение определения биомаркеров в сыворотке крови и моче больных системной красной волчанкой // Клиническая нефрология, 2014. Т. 1. С. 10-14. [Rebrov A.P., Zakharova N.B., Oksenchuk A.N., Karpova O.G., Patrikeeva D.A., Popykhova E.B. Diagnostic value of definition of biomarkers in serum of blood and urine of patients with a system red volchanka. *Klinicheskaya nefrologiya = Clinical Nephrology*, 2014, Vol. 1, pp. 10-14. (In Russ.)]

17. Сerezhenkov А.В., Горелов А.И. Цитокиновый профиль крови пациентов с хроническим пиелонефритом // Здоровье – основа человеческого потенциала – проблемы и пути их решения, 2013, Т. 8, № 1. С. 510-512. [Serezhenkov A.V., Gorelov A.I. Cytokines a profile of blood of patients with chronic pyelonephritis. *Zdorovye – osnova chelovecheskogo potentsiala – problemy i puti ikh resheniya = Health – a Basis of Human Potential – a Problem and a Way of Their Decision*, 2013, Vol. 8, no. 1, pp. 510-512. (In Russ.)]

18. Смирнов А.В., Добронравов В.А., Румянцев А.Ш., Шилов Е.М., Ватазин А.В., Каюков И.Г., Кучер А.Г., Есаян А.М. Национальные рекомендации. Острое повреждение почек: основные принципы диагностики, профилактики и терапии. Часть 1 // Нефрология. 2016. Т.20, № 1. С. 79-104. [Smirnov A.V., Dobronravov V.A., Rumyantsev A.Sh., Shilov E.M., Vatazin A.V., Kayukov I. G., Kucher A.G., Yesayan A.M. National recommendations. Sharp injury of kidneys: basic principles of diagnostics, prevention and therapy. Part 1. *Nefrologiya = Nephrology*, 2016, Vol. 20, no. 1, pp. 79-104. (In Russ.)]

19. Чеботарева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В. Молекулярные механизмы интерстициального фиброза при прогрессирующих заболеваниях почек // Нефрология и диализ, 2006. № 1. С. 26-35. [Chebotareva N.V., Bobkova I.N., Kozlovskaya L.V. Molecular mechanisms of interstitial fibrosis in progressive kidney diseases (literature Review). *Nefrologiya i dializ = Nephrology and Dialysis*, 2006, no. 1, pp. 26-35. (In Russ.)]

20. Швецов М.Ю., Чжен Аньтаи, Козловская Л.В., Серова Е.В. Мочевая экскреция факторов регуляции ангиогенеза и маркеров повреждения почек при хроническом гломерулонефрите: значение в оценке прогрессирования // Терапевтический архив, 2014. Т. 87, № 6. С. 75-82. [Shvetsov M.Yu., Zheng A., Kozlovskaya L.V., Serova A.G. Urinary excretion of angiogenesis regulatory factors and renal injury markers in chronic glomerulonephritis:

Significance in the assessment of progression]. [Article in Russian; Abstract available in Russian from the publisher. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2015, Vol. 87, no. 6, pp. 75-82. (In Russ.)]

21. Anderson G.P. Free immunoglobulin light chains in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2012, Vol. 185, no. 8, pp. 793-795.

22. Belgareh-Touzé N., Léon S., Erpapazoglou Z., Stawiecka-Mirota M., Urban-Grimal D., Haguenaue-Tsapis R. Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. *Biochem. Soc. Trans.*, 2008, Vol. 36 (Pt 5), pp. 791-796.

23. Champaboon C., Sappington K.J., Guenther B.D., Ross K.F., Herzberg M.C. Calprotectin S100A9 calciumbinding loops I and II are essential for keratinocyte resistance to bacterial invasion. *J. Biol. Chem.*, 2009, Vol. 284, no. 11, pp. 7078-7090.

24. Chiangjong W., Thongboonkerd V. Calcium oxalate crystals increased enolase-1 secretion from renal tubular cells that subsequently enhanced crystal and monocyte invasion through renal interstitium. *Sci. Rep.*, 2016, no. 6, 24064. doi: 10.1038/srep24064.

25. Cohen G., Rudnicki M., Hörl W.H. Uremic toxins modulate the spontaneous apoptotic cell death and essential functions of neutrophils. *Kidney Int.*, 2001, Vol. 59, pp. S48-52.

26. Damman K., Masson S., Hillege H.L., Voors A.A., van Veldhuisen D.J., Rossignol P., Proietti G., Barbuzzi S., Nicolosi G.L., Tavazzi L., Maggioni A.P., Latini R. Tubular damage and worsening renal function in chronic heart failure. *JACC Heart Fail.*, 2013, Vol. 1, no. 5, pp. 417-424.

27. Desjardins L., Liabeuf S., Lenglet A., Lemke H.-D., Vanholder R., Choukroun G., Massy Z.A., E.U.T.W. Group. Association between free light chain levels, and disease progression and mortality in chronic kidney disease. *Toxins*, 2013, Vol. 5, no. 11, pp. 2058-2073.

28. Eltoweissy M., Müller G.A., Bibi A., Nguye P.V., Dihazi G.H., Müller C.A., Dihazi H. Proteomics analysis identifies PARK7 as an important player for renal cell resistance and survival under oxidative stress. *Mol. Biosyst.*, 2011, Vol. 7, no. 4, pp. 1277-1288.

29. Esparvarinha M., Nickho H., Mohammadi H., Aghebati-Maleki L., Abdolalizadeh J., Majidi J. The role of free kappa and lambda light chains in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Biomed. Pharmacother.*, 2017, Vol. 91, pp. 632-644.

30. Frosch M., Metze D., Foell D., Vogl T., Sorg C., Sunderkötter C., Roth J. Early activation of cutaneous vessels and epithelial cells is characteristic of acute systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Exp. Dermatol.*, 2005, Vol. 14, no. 4, pp. 259-265.

31. Hamed S.A. The effect of antiepileptic drugs on the kidney function and structure. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, 2017, Vol. 10, no. 9, pp. 993-1006.

32. Hutchison C.A., Harding S., Hewins P., Mead G.P., Townsend J., Bradwell A.R., Cockwell P. Quantitative assessment of serum and urinary polyclonal free light chains in patients with chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2008, Vol. 3, no. 6, pp. 1684-1690.

33. Jia J., Arif A., Terenzi F., Willard B., Plow E.F., Hazen S.L., Fox P.L. Target-selective protein S-nitrosylation by sequence motif recognition. *Cell*, 2014, Vol. 159, pp. 623-634.

34. Jungbauer C.G., Birner C., Jung B., Buchner S., Lubnow M., von Bary C., Endemann D., Banas B., Mack M., Böger C.A., Riegger G., Luchner A. Kidney injury molecule-1 and N-acetyl-β-D-glucosaminidase in chronic heart failure: possible biomarkers of cardiorenal syndrome. *Eur. J. Heart Fail.*, 2011, Vol. 13, no. 10, pp. 1104-1110.

35. Ko G.J., Grigoryev D.N., Linfert D., Jang H.R., Watkins T., Cheadle C., Racusen L., Rabb H. Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI to CKD transition. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2010, Vol. 298, pp. 1472-1483.

36. Nejat M., Pickering J.W., Walker R.J., Endre Z.H. Rapid detection of acute kidney injury by plasma cystatin C in the intensive care unit. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2010, Vol. 25, pp. 3283-3289.

37. Merchant M.L., Klein J.B. Proteomics and diabetic nephropathy. *Semin. Nephrol.*, 2007, Vol. 27, pp. 627-636.

38. Ossipova O., Chu C.W., Fillatre J., Brott B.K., Itoh K., Sokol S.Y. The involvement of PCP proteins in radial cell intercalations during *Xenopus* embryonic development. *Dev. Biol.*, 2015, Vol. 408, no. 2, pp. 316-327.

39. Rajan V., Mitch W.E. Ubiquitin, proteasomes and proteolytic mechanisms activated by kidney disease. *Biochim Biophys Acta.*, 2008, Vol. 1782, no. 12, pp. 795-799.

40. Shen S.J., Hu Z.X., Li Q.H. Implications of the changes in serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin and cystatin C in patients with chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*, 2014, Vol. 19, no. 3, pp. 29-35.

41. Schiepati A., Remuzzi G. Chronic renal disease as a public health problem: Epidemiology, social and economic implications. *Kidney Int.* 2005, Vol. 68, Suppl. 98, pp. S7-S10.

42. Schroeder H.W.Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 125, no. 2, Suppl. 2, pp. 41-52.

43. Thongboonkerd V. Study of diabetic nephropathy in the proteomic era. *Contrib. Nephrol.*, 2011, Vol. 170, pp. 172-183.

44. Turnbull A.P., Ioannidis S., Krajewski W.W., Pinto-Fernandez A., Heride C., Martin A.C.L., Tonkin L.M., Townsend E.C., Buker S.M., Lancia D.R., Caravella J.A., Toms A.V., Charlton T.M., Lahdenranta J., Wilker E., Follows B.C., Evans N.J., Stead L., Alli C., Zarayskiy V.V., Talbot A.C., Buckmelter A.J., Wang M., McKinnon C.L., Saab F., McGouran J.F., Century H., Gersch M., Pittman M.S., Marshall C.G., Raynham T.M., Simcox M., Stewart L.M.D., McLoughlin S.B., Escobedo J.A., Bair K.W., Dinsmore C.J., Hammonds T.R., Kim S., Urbé S.,

Clague M.J., Kessler B.M., Komander D. Molecular basis of USP7 inhibition by selective small-molecule inhibitors. *Nature*, 2017, Vol. 550, no. 7677, pp. 481-486.

45. Uchil P.D., Nagarajan A., Kumar P. β -Galactosidase. *Cold Spring Harb Protoc*, 2017, Vol. 10, pdb.top096198. doi: 10.1101/pdb.top096198

46. Verzola D., Gandolfo M.T., Gaetani G., Ferraris A., Mangerini R., Ferrario F., Villaggio B., Gianiorio F., Tosetti F., Weiss U., Traverso P., Mji M., Deferrari G., Garibotto G. Accelerated senescence in the kidneys of patients with type 2 diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2008, Vol. 295, no. 5, pp. 1563-1573.

47. Vogl T., Tenbrock K., Ludwig S., Leukert N., Ehrhardt C., van Zoelen M.A. Nacken W., Foell D., van der Poll T., Sorg C., Roth J. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 9, pp. 1042-1049.

48. Wang N.S., McHeyzer-Williams L.J., Okitsu S.L., Burris T.P., Reiner S.L., McHeyzer-Williams M.G. Divergent transcriptional programming of class-specific B cell memory by T-bet and ROR α . *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, no. 6, pp. 604-611.

49. Zubowska M., Wyka K., Fendler W., Mlynarski W., Zalewska-Szewczyk B. Interleukin-18 as a marker of chronic nephropathy in children after anticancer treatment. *Disease Markers*, 2013, Vol. 35, pp. 811-818.

Авторы:

Захарова Н.Б. — д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

Пастушкова Л.Х. — д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУН «ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН», Москва, Россия

Лях Р.В. — аспирант кафедры урологии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

Понукалин А.Н. — к.м.н., доцент кафедры урологии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

Вараксин Н.А. — заведующий лабораторией цитокинов АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Офицеров В.И. — д.б.н., заместитель генерального директора АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Кононихин А.С. — к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории масс-спектрометрии биомакромолекул ФГБУН «Институт энергетических проблем химической физики имени В.Л. Тальрозе РАН», Москва, Россия

Ларина И.М. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией ФГБУН «ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН», Москва, Россия

Николаев Е.Н. — д.ф.-м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий лабораторией масс-спектрометрии биомакромолекул ФГБУН «Институт энергетических проблем химической физики имени В.Л. Тальрозе РАН», Москва, Россия

Authors:

Zakharova N.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Saratov State V. Razumovsky Medical University, Saratov, Russian Federation

Pastushkova L.Kh., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Lyakh R.V., Postgraduate Student, Department of Urology, Saratov State V. Razumovsky Medical University, Saratov, Russian Federation

Ponukalin A.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Urology, Saratov State V. Razumovsky Medical University, Saratov, Russian Federation

Varaksin N.A., Chief, Laboratory of Cytokines, JSC "Vector-Best", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Ofitserov V.I., PhD, MD (Biology), Deputy General Director for Research, JSC "Vector-Best", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Kononikhin A.S., PhD (Physics and Mathematics), Leading Research Associate, Laboratory of Mass Spectrometry of Biomacromolecules, V. Talrose Institute of Energy Problems in Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Larina I.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Laboratory, Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Nikolaev E.N., PhD, MD (Physics and Mathematics), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Chief, Laboratory of Mass Spectrometry of Biomacromolecules, V. Talrose Institute of Energy Problems in Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 10.03.2018

Отправлена на доработку 13.03.2018

Принята к печати 22.10.2018

Received 10.03.2018

Revision received 13.03.2018

Accepted 22.10.2018