

А.Б. Бухарина¹, А.О. Федулкина², К.Н. Демидова²,
А.В. Пенто¹, Л.Д. Мальцева²,
Я.О. Симановский¹, С.М. Никифоров¹, О.Л. Морозова²



¹Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
(Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

Омиксные технологии в скрининге повреждения почек у детей с врожденными уропатиями

Обоснование. Первичный пузырно-мочеточниковый рефлюкс (ПМР) — наиболее распространенная врожденная уропатия (ВУ) у детей, приводящая к развитию рефлюкс-нефропатии и хронической болезни почек, достигающей терминальной стадии у 25–60% пациентов. Недостаточная чувствительность существующих методов инструментальной и лабораторной диагностики начальных этапов повреждения почечной паренхимы диктует необходимость разработки новых неинвазивных технологий скрининга и мониторинга состояния почек у пациентов с ВУ. **Цель исследования** — оценить возможность разделения групп здоровых детей и детей с повреждением почек при ВУ на основе анализа масс-спектров летучих органических соединений (ЛОС, волатолом) образцов мочи, зарегистрированных без пробоподготовки при нормальных условиях. **Методы.** Проведено исследование образцов мочи 42 пациентов (средний возраст — 5,4±2,3 года), разделенных на две группы: группа 1 — 24 ребенка с ВУ (ПМР II–V степеней), группа 2 (сравнения) — 18 пациентов с малой хирургической патологией без патологии мочевого выделительной системы. Сбор мочи осуществлялся при первичном установлении диагноза ВУ и до начала лечения. Анализ состава ЛОС образцов проводился методом экспресс-анализа биологических объектов при атмосферном давлении без предварительной подготовки с помощью масс-спектрометра с ионизацией ЛОС излучением лазерной плазмы. Мочевые уровни маркеров воспаления (MCP-1, IL-8, IL-18), ангиогенеза (VEGF) и фиброза (TGF-β1) измерялись методом твердофазного ИФА. **Результаты.** У пациентов группы 1 с ВУ (ПМР) при анализе масс-спектров были выявлены изменения состава ЛОС мочи, которые позволили отличить эти образцы от группы 2 (сравнения). Уровень креатинина и скорость клубочковой фильтрации (СКФ) в обеих группах не имели статистических отличий. В моче детей с ВУ (ПМР) наблюдалось повышение концентрации маркеров воспаления MCP-1, IL-18, IL-8, ангиогенеза VEGF и фиброза TGF-β1 ($p < 0,001$). У пациентов группы 1 с ВУ (ПМР) концентрация маркеров не зависела от степени рефлюкса. **Заключение.** Проведенное исследование показало, что в регистрируемых масс-спектрах существует набор пиков, по которым возможно разделение на группы здоровых и больных, и продемонстрировало потенциал масс-спектрометрического анализа волатолома для обнаружения повреждения почек у детей с ВУ. Использование стандартных анализов креатинина и СКФ не позволило найти пороговое значение, которое позволяло бы разделить на группы больных и здоровых. Повышение в моче детей с ВУ биомаркеров воспаления, ангиогенеза и фиброза подтверждало наличие персистирующего повреждения почек, гипоксии паренхимы, активации фиброза и воспаления в ней.

Ключевые слова: летучие органические соединения, биомаркеры, масс-спектрометрия, повреждение почек, врожденная уропатия, дети

Для цитирования: Бухарина А.Б., Федулкина А.О., Демидова К.Н., Пенто А.В., Мальцева Л.Д., Симановский Я.О., Никифоров С.М., Морозова О.Л. Омиксные технологии в скрининге повреждения почек у детей с врожденными уропатиями. Вестник РАМН. 2022;77(5):354–361. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn2107>

Обоснование

Заболевания почек занимают лидирующие позиции в структуре всей патологии у детей, встречаясь в популяции с частотой от 5,4 до 32,5% [1]. Первичный пузырно-мочеточниковый рефлюкс (ПМР) относится к группе диспластических заболеваний почек [2] и является одной из наиболее распространенных врожденных уропатий (ВУ) у детей [3], приводящих к развитию рефлюкс-нефропатии и хронической болезни почек [4], которая достигает конечной стадии у 25–60% пациентов [5].

В настоящее время диагностика почечной недостаточности основывается на определении уровня сывороточного креатинина, альбуминурии и скорости клубочковой фильтрации (СКФ) [6, 7]. Однако эти индикаторы не являются чувствительными и специфичными на ранних этапах повреждения почек и не отражают полную картину развития патологии [8].

Так, типы 1 и 2 рефлюкс-нефропатии соответствуют компенсаторной гиперфильтрации оставшихся неповрежденными нефронов, поэтому не сопровождаются изменениями стандартных биохимических показателей —

креатинина и СКФ [9]. Повышение уровня данных маркеров в крови возможно только при 3 типе рефлюкс-нефропатии, которая соответствует необратимой стадии декомпенсации процесса гиперфильтрации и свидетельствует о гибели более 70% нефронов.

Определение уровня сывороточного креатинина оставалось «золотым стандартом» в течение почти столетия, несмотря на многочисленные общепризнанные ограничения его использования в качестве косвенного маркера повреждения почек, включая отсроченное выявление повреждения [10]. Кроме того, возможно повышение его концентрации при неповрежденных клубочках или канальцах [11].

Таким образом, на сегодняшний день отсутствуют достоверные лабораторные методы диагностики раннего повреждения почек и существует потребность в поиске и разработке новой панели биомаркеров повреждения почек.

В последнее время активно исследуется состав летучих органических соединений (ЛОС), выделяемых человеком. Показано, что набор этих соединений, образующих волатолом человека, содержит информацию о состоянии

организма и его анализ может быть использован в диагностических целях [9].

К ЛОС принято относить химические соединения, имеющие конечное значение давления паров при температуре, не превышающей порог их термического разложения. Наибольший интерес представляют соединения, имеющие значительное давление насыщенного пара при комнатной температуре. Путем детектирования таких соединений могут быть реализованы методы анализа пробы в состоянии «как она есть», без использования пробоподготовки или испарения при сильном нагреве. В настоящее время при исследовании волатолома человека обнаружено 2577 ЛОС, которые связаны с процессами жизнедеятельности и потенциально могут быть использованы для целей диагностики [12]. В моче человека зарегистрировано 444 соединения различных химических классов [13].

Для выделения значимой для диагностики заболевания информации из анализа волатолома используются два подхода — таргетный метод, ориентированный на поиск и изучение конкретных химических соединений — биомаркеров, и нетаргетный подход.

В первом случае индикатором заболевания является наличие в пробе соединений-маркеров в определенной концентрации, причем каждое из соединений точно установлено. Такой подход обычно реализуется с использованием хромато-масс-спектрометров, что позволяет идентифицировать соединения, но требует значительного времени для проведения анализа [14].

При нетаргетном подходе информацию получают из соотношения концентраций множества соединений,

причем в случае масс-спектрометрии можно не проводить детальный анализ спектра, а выполнить сравнительный анализ «необработанных» спектров больных и здоровых пациентов. Нетаргетный метод, использованный в нашем исследовании, требует применения масс-спектрометров, обеспечивающих одновременное определение множества ЛОС [15]. Мы использовали лазерный масс-спектрометр, разработанный авторами ранее. Ключевое отличие прибора — оригинальный способ ионизации Atmospheric pressure laser plasma ionization (APLPI) [16, 17], гарантирующий минимальное время анализа и, в отличие от часто применяемых для анализа волатолома способов PTR и SIFT [18], использующий большее количество каналов ионизации и тем самым обеспечивающий ионизацию соединений более широкого класса. На настоящий момент в литературе не встречается упоминаний об обнаружении повреждения почек у детей с ВУ с помощью масс-спектрометрического анализа ЛОС.

Цель исследования — оценить возможность разделения групп здоровых детей и детей с повреждением почек при ВУ на основе анализа масс-спектров ЛОС образцов мочи.

Методы

Дизайн исследования

Наше пилотное, проспективное, одномоментное, одноцентровое, диагностическое исследование направлено на определение возможности разделения групп здоровых детей и детей с повреждением почек при ВУ

A.B. Bukharina¹, A.O. Fedulkina², K.N. Demidova², A.V. Pento¹, L.D. Maltseva²,
Y.O. Simanovsky¹, S.M. Nikiforov¹, O.L. Morozova²

¹Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Omics Technologies in Screening for Kidney Disease in Children with Congenital Uropathy

Background. Primary vesicoureteral reflux (VUR) is the most common congenital uropathy (CU) in children, leading to the development of reflux nephropathy and chronic kidney disease, reaching the terminal stage in 25–60% of patients. The insufficient sensitivity of modern methods of instrumental and laboratory diagnostics of the initial stages of renal parenchyma damage dictates the need to develop new non-invasive technologies for screening and monitoring kidney conditions in patients with CU. **Aims** — to evaluate the possibility of separating groups of healthy children and children with kidney damage with CU using the analysis of the mass spectra of volatile organic compounds (VOCs) in urine samples. **Methods.** This study involved 42 patients (average age 5.4 ± 2.3 years), divided into 2 groups: group 1 — 24 children with congenital uropathies (grade II–V PMR) and comparison group 2 — 18 patients with minor surgical pathology without pathology of the urinary system. Urine samples were collected before the start of treatment. Composition analysis of VOCs samples was carried out through express-analysis method for biological objects at atmospheric pressure without preliminary preparation using a mass spectrometer with ionization by laser plasma radiation. Urinary levels of markers of inflammation (MCP-1, IL-8, IL-18), angiogenesis (VEGF) and fibrosis (TGF-β1) were measured by solid-phase ELISA. **Results.** Composition changes in urine VOCs were detected in group 1 patients with congenital uropathies (VUR). These changes made it possible to distinguish group 1 samples from the comparison group 2. Creatinine level and glomerular filtration rate (GFR) in both groups had no statistical difference. An increase in concentration of inflammatory markers MCP-1, IL-18, IL-8, VEGF angiogenesis and TGF-β1 fibrosis was observed in the urine of children with congenital uropathies (VUR) ($p < 0.001$). In group 1 patients the concentration of markers did not correlate with the reflux level. **Conclusions.** The performed research allowed to find a set of peaks in the recorded mass spectra, according to which it is possible to divide groups into healthy and sick. It also demonstrated the potential of volatolom analysis to detect kidney damage in children with congenital uropathies. The use of standard methods: creatinine and GFR did not allow us to find a threshold value to divide patient into healthy and sick groups. The increase of biomarkers of inflammation, angiogenesis and fibrosis in the urine of children with congenital uropathies confirmed the presence of persistent kidney damage, parenchymal hypoxia, activation of fibrosis and inflammation in children with CU kidneys.

Keywords: volatile organic compounds, biomarkers, mass spectrometry, kidney damage, congenital uropathy, children

For citation: Bukharina AB, Fedulkina AO, Demidova KN, Pento AV, Maltseva LD, Simanovsky YO, Nikiforov SM, Morozova OL. Omics Technologies in Screening for Kidney Disease in Children with Congenital Uropathy. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2022;77(5):354–361. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn2107>

на основе анализа масс-спектров ЛОС образцов мочи. Кроме того, было проведено сравнение результатов масс-спектрометрии с классическими индикаторами (СКФ и уровнем креатинина сыворотки крови). В образцах мочи были определены молекулярными маркерами трансформирующий фактор роста β_1 (TGF- β_1) [19], фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [20], интерлейкин-8 (IL-8), интерлейкин-18 (IL-18), моноцитарный хемоаттрактантны протеин-1 (MCP-1) [21], которые использовались для раннего и неинвазивного выявления фиброза, гипоксии и хронического воспаления в почках соответственно.

Общая характеристика пациентов групп исследования

Клинический этап исследования выполнялся на базе ГБУЗ «ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского ДЗМ». Исследование образцов мочи проведено у 42 мальчиков (средний возраст — 5,4 + 2,3 года) при первичном установлении диагноза, разделенных на две группы: группа 1 — 24 ребенка с ВУ (пузырно-мочеточниковым рефлюксом (ПМР) II–V степеней); группа 2 (сравнения) — 18 пациентов с малой хирургической патологией без патологии мочевыделительной системы.

Критериями исключения из исследования были интеркуррентные формы инфекционно-воспалительных заболеваний, сепсис, сопутствующая патология (сахарный диабет, дыхательная недостаточность, сердечно-сосудистая недостаточность), отказ родителей/представителей ребенка от участия в исследовании.

Лабораторные и клинико-инструментальные методы исследования

Диагноз ВУ был поставлен на основании комплекса стандартных и специализированных методов обследования, который включал ультразвуковое исследование с импульсно-волновой доплерометрией почечных сосудов, микционную цистографию, экскреторную урографию, клинические анализы крови и мочи, биохимический анализ крови с определением уровней креатинина и мочевины, расчет СКФ по Шварцу, бактериологическое исследование мочи. Градация степени ПМР проводилась в соответствии с классификацией Международного комитета по исследованию рефлюкса у детей (IRSC) [22].

Исследование содержания мочевых уровней биомаркеров

Сбор средней порции утренней мочи осуществлялся у пациентов с первично установленным диагнозом ВУ и до начала лечения. После центрифугирования 10 мин при 14 000 g производилось аликвотирование образцов в пластиковые пробирки типа эппендорф и хранение при температуре –80 °С до проведения исследований. Содержание мочевых биомаркеров воспаления — интерлейкина-8 (IL-8), интерлейкина-18 (IL-18), моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1), ангиогенеза — васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) и фиброгенеза — трансформирующего фактора роста β_1 (TGF- β_1) измерялось методом твердофазного иммуоферментного анализа с использованием наборов ELISA (BenderMed-Systems, Австрия) на момент клинико-лабораторной ремиссии ИМП.

Масс-спектрометрические исследования

Основное отличие проводимого нами эксперимента — непосредственный масс-спектрометрический анализ ЛОС, выделяемых пробами мочи при комнатной

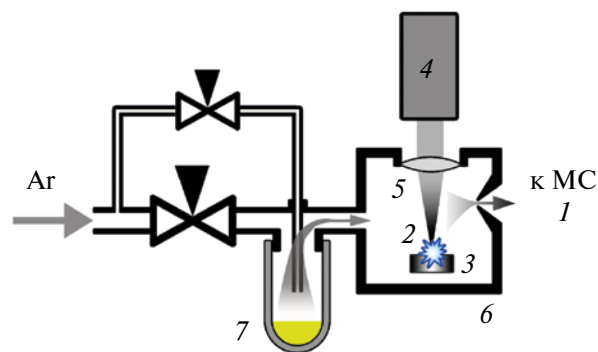


Рис. 1. Схема масс-спектрометра с устройством ввода ЛОС: 1 — времяпролетный масс-спектрометр рефлектрон; 2 — лазерная плазма, создаваемая импульсным излучением лазера; 3 — металлическая мишень; 4 — импульсный Nd:YAG-лазер; 5 — линза с фокусным расстоянием 5 см; 6 — камера ионизации; 7 — пробирка с пробой мочи, установленная на пневморазъеме

температуре и атмосферном давлении. К образцам мочи, полученным от пациентов, не применялись никакие процедуры дополнительной обработки и пробоподготовки. Поток ЛОС, формирующийся за счет испарения соединений с открытой поверхности жидкой пробы, анализировался без использования хроматографического разделения. Схема установки приведена на рис. 1. В эксперименте использовался уникальный лазерный масс-спектрометр, разработанный авторами [16, 17]. Прибор состоит из времяпролетного масс-спектрометра рефлектрон с квадрупольной транспортной системой (QTOF) и ионного источника, работающего при атмосферном давлении. Особенностью используемого прибора является применение для ионизации ЛОС, поступающих с поверхности жидкого образца жесткого ультрафиолетового излучения лазерной плазмы (см. 2 на рис. 1), создаваемой импульсным лазерным излучением на поверхности металлической мишени [14]. Для создания плазмы использовался импульсный Nd:YAG-лазер с диодной накачкой RL-03/355 (ООО «ЭЛС-94»). Частота следования импульсов составляла 300 Гц, длительность — 0,5 нс, энергия в импульсе — 350 мкДж. Излучение лазера фокусировалось на поверхность мишени линзой с фокусным расстоянием 5 см, что обеспечивало плотность мощности излучения более 10¹¹ Вт/см².

Перед измерениями образцы размораживали при комнатной температуре в течение 10 мин. Пробы разливались по микроцентрифужным пробиркам порциями по 20 мкл. Микроцентрифужные пробирки с пробами последовательно устанавливались на герметичный пневматический разъем и продувалась потоком чистого аргона (99,995). Испаряющиеся с поверхности пробы ЛОС мочи поступали в потоке аргона в герметичную камеру (6 на рис. 1), где происходила их ионизация. Чтобы исключить попадание окружающего атмосферного воздуха внутрь камеры при смене пробирок, в камере поддерживалось избыточное давление 30 Торр по отношению к давлению воздуха в лаборатории. Масс-спектр ЛОС каждого образца записывался в течение 150 с, из которых в первые 30 с происходили вытеснение воздуха в пробирках аргоном и стабилизация масс-спектров (интервал I, выделенный синим на рис. 2).

Процесс регистрации масс-спектров проиллюстрирован на рис. 2, где приведена зависимость полного ионного тока и показан единичный масс-спектр для одной из проб. Выбросы полного ионного тока в начале и конце

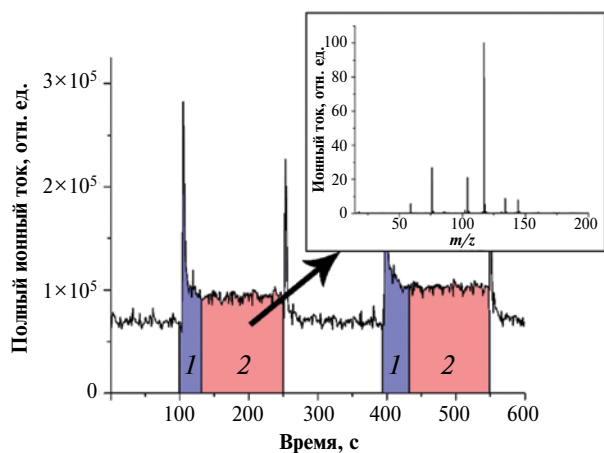


Рис. 2. Зависимость полного ионного тока от времени при исследовании проб мочи: 1 — участок вытеснения воздуха в пробирке аргоном, длительность ~ 30 с (закрашен синим); 2 — участок записи стабильного масс-спектра, длительность ~ 120 с (закрашен красным) и при установке пустой пробирки (незакрашенная область). На врезке показан единичный масс-спектр пробы мочи

измерений образца (см. рис. 2) вызваны сменой пробирок, которые в начальный момент содержат лабораторный воздух, приводящий к изменениям масс-спектра. В экспериментах регистрировались только положительные ионы, что обусловлено конструкцией прибора.

Для уменьшения влияния изменения состава воздуха в лаборатории и дрейфа прибора на результат анализ проб производился в случайном порядке, а состав экспериментаторов, находящихся в лаборатории, не изменялся в течение всего эксперимента. Оператору сообщался только условный номер, по которому невозможно определить принадлежность пробы к конкретной группе.

Этическая экспертиза

Все этапы исследования одобрены локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (выписка из протокола № 08-21 очередного заседания ЛЭК от 19.05.2021).

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки. Проект был пилотным, и размер выборки предварительно не рассчитывался.

Методы статистического анализа данных. Обработка полученных масс-спектров проводилась в самостоятельно разработанной программе в среде Python 3.7. В регистрируемом диапазоне масс до 18–500 а.е.м. было выделено 342 уникальных пика, которые присутствуют почти во всех образцах. Значимыми пиками мы считали пики в суммарном масс-спектре с амплитудой, соответствующей регистрации в среднем не менее 1 иона в 1 с. Ограничение разрешения, используемого в работе масс-спектрометра, не позволяет избежать интерференции и идентифицировать соединения, соответствующие найденным пикам. Для выделения пиков, содержащих информацию о наличии или отсутствии заболевания, был применен критерий Краскела–Уоллиса.

Данные результатов исследования биомаркеров мочи были представлены в виде медианы (и межквартильного интервала) и проанализированы с использованием программного обеспечения R-statistics версии 3.3.2. Оценивали статистически значимые отличия от груп-

пы контроля с использованием критерия суммы рангов Манна–Уитни. Статистические тесты проводились на уровне значимости 5%.

Результаты

Объекты (участники) исследования

Объектом исследования послужили образцы мочи 42 пациентов (средний возраст — 5,4 + 2,3 года), разделенных на две группы: группа 1 — 24 ребенка с ВУ (ПМП II–V степеней), группа 2 (сравнения) — 18 пациентов с малой хирургической патологией и без патологии мочевыделительной системы.

Основные результаты исследования

Анализ массива данных с использованием критерия Краскела–Уоллиса показал, что в массиве, состоящем из 342 пиков, существует всего 20 пиков с $p < 0,05$, по которым можно отличить группу пациентов с заболеваниями от контрольной группы. Перечень пиков с соответствующими p -значениями приведены в табл. 1. Из этих пиков выбраны четыре пика, имеющие в своем наборе наибольшее количество ненулевых значений. К этим четырем был применен метод главных компонент (МГК).

Результат анализа МГК представлен на рис. 3. Разделение областей проводилось методом линейного дискриминантного анализа. Как видно из рис. 3, в координатах двух первых главных компонент наблюдается разделение двух групп пациентов. Это говорит о том, что в ЛОС, собираемых над поверхностью пробы мочи при комнатной температуре, содержится информация о состоянии пациента и эта информация может быть использована для целей диагностики заболеваний. На основе данных рис. 3 можно оценить общепринятые статистические показатели — чувствительность и селективность. Для приведен-

357

Таблица 1. Выделенные пики в образцах мочи групп исследования

m/z	p -value
42	0,00359864882425457
66	0,0213436538150324
68	0,000186527014749273
77	0,0327626450788598
83	0,0446541484831718
84	0,0193710994584939
91	0,0288293008843387
93	0,0446541484831718
95	0,0253035785681753
105,1	0,0221679057529888
107	0,0371160759840020
108	0,0420124648678192
123	0,0404646830589061
124	0,0207284137141232
125	0,0228644186154725
157	0,0168124290153604
157,1	0,0443854637881736
167	0,0319047361350467
258,1	0,0435339968892050
287,1	0,00572717646414131

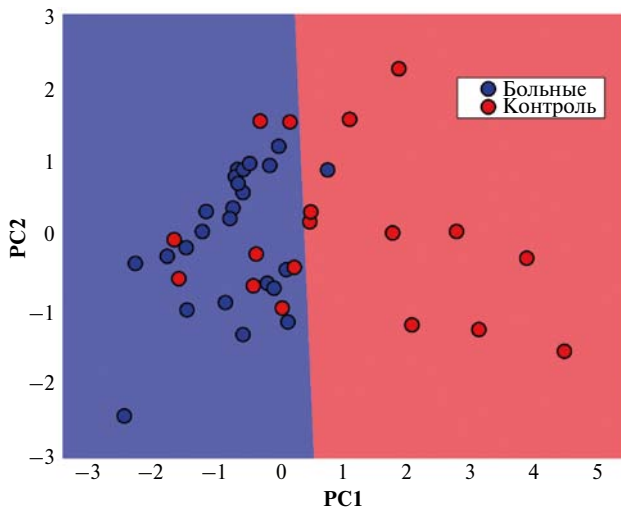


Рис. 3. Результат применения метода главных компонент к анализу масс-спектров ЛОС мочи больных (синие точки) и здоровых (красные точки)

ных результатов они составят соответственно $22/23 = 0,96$ и $10/18 = 0,56$. Очевидно, что для получения более точных результатов необходимо увеличить объем выборки и стратифицировать пациентов как в контрольной группе, так и в группе больных не только по полу, но и возрасту. Это связано с тем, что в составе ЛОС, кроме изменений, связанных с заболеванием, возможно, наблюдаются возрастные изменения.

Сравнение результатов масс-спектрометрического исследования и результатов анализа на креатинин и СКФ представлено на рис. 4, где приведено распределение результатов анализа для больных (красные точки), и здоровых (синие точки) пациентов в координатах значения анализа — амплитуда первой главной компоненты масс-спектров. Как видно из рисунка, по полученным данным анализов креатинина и СКФ невозможно найти пороговое значение, которое позволяет разделить пациентов на группы больных и здоровых. Это видно и из сравнения средних величин результатов анализа для двух групп, приведенных в табл. 2. Поэтому в нашем случае ни креатинин, ни СКФ не могут быть использованы в качестве

индикатора наличия заболевания. В то же время масс-спектрометрические данные позволяют достаточно эффективно разделить группы, как это показано на рис. 4. Разделение областей, как и в первом случае, проводилось методом линейного дискриминантного анализа.

Результаты исследования СКФ и уровня креатинина сыворотки крови представлены в табл. 2. Статистически значимых отличий данных показателей между группами не выявлено.

Результаты исследования мочевых уровней IL-8, IL-18, MCP-1, VEGF и TGF-β1 представлены в табл. 3. В моче детей с ВУ наблюдалось повышение концентрации маркеров воспаления MCP-1 ($p < 0,001$), IL-18 ($p < 0,001$), IL-8 ($p < 0,003$), ангиогенеза VEGF ($p < 0,001$) и фиброза TGF-β1 ($p < 0,004$) при сравнении с группой без ВУ. Следует отметить, что в группе пациентов с ВУ концентрация маркеров не зависела от степени ПМР ($p > 0,05$).

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

Выполненный эксперимент показал, что нетаргетный анализ, основанный на статистической обработке полученных масс-спектров ЛОС образцов мочи, позволяет выделить различия между группами больных и здоровых пациентов. В регистрируемых масс-спектрах существует набор пиков, применимых для обнаружения повреждения почек у детей с ВУ. В тех же группах пациентов использование стандартных анализов креатинина и СКФ не дало возможности найти пороговое значение, которое позволяло разделить группы больных и здоровых. Повышение в моче биомаркеров воспаления, ангиогенеза и фиброза подтверждало наличие персистирующего повреждения почек, гипоксии паренхимы, активации фиброза и воспаления в ней у детей с ВУ.

Обсуждение основного результата исследования

Проведенное исследование показало, что масс-спектрометрический анализ летучих компонентов мочи, проводимый без пробоподготовки, в состоянии образца «как он есть», потенциально может иметь диагностическое применение. Новый метод ионизации ЛОС позволяет выделить различия между группами здоровых

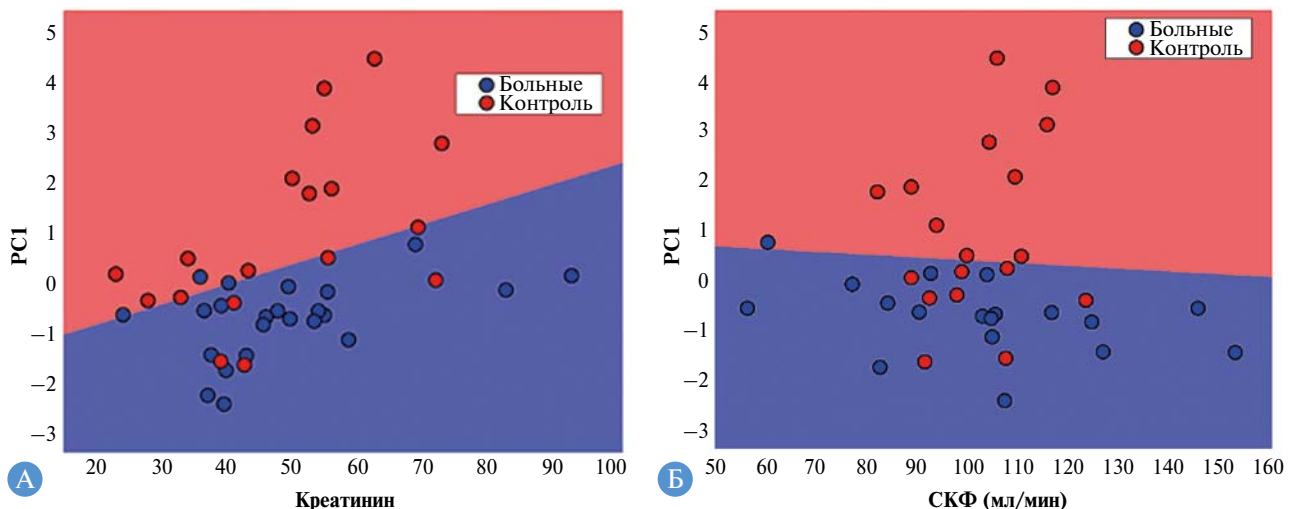


Рис. 4. Сравнение результатов масс-спектрометрического анализа ЛОС и теста на креатинин и СКФ: А — сравнение с тестом на креатинин; Б — сравнение с тестом на СКФ

Таблица 2. Характеристики групп исследования

Показатель	Группы исследования (n = 42)	
	Контроль (n = 18)	ВУ (n = 24)
Возраст (M±SD), годы	6,4±2,3	4,5±2,7
Креатинин сыворотки крови, мкмоль/л	52	48,9
СКФ (M±SD), мл/мин/1,73 м ²	130	100,74

Примечание. СКФ — скорость клубочковой фильтрации.

Таблица 3. Мочевые уровни маркеров воспаления, факторов фибро- и ангиогенеза

Показатель	Группы исследования (n = 42)						
	Контроль (n = 18)			ВУ (n = 24)			
	M	LQ	UQ	M	LQ	UQ	p
IL-8, пг/мл	6,54	3,5	8	56,45	39,3	88,75	0,003
IL-18, пг/мл	12,45	8,25	16,75	26,3	21	42	0,000001
MCP-1, пг/мл	91,4	48,5	132,5	162	131,25	264,25	0,001
VEGF, пг/мл	107	62	133	158	118,75	264,25	0,0006
TGF-β1, нг/мл	14,7	11	18,75	37,35	32,75	46,75	0,004

Примечание. M — медиана; LQ — нижний квартиль; UQ — верхний квартиль; p — критерий достоверности различий по отношению к показателям группы контроля.

и больных пациентов. Достоинством метода является минимальное время анализа, недостижимое при использовании широко применяемых для подобных исследований хромато-масс-спектрометров. Как было показано, время анализа одной пробы в наших экспериментах составляет не более 3 мин. Для проведения таргетного анализа необходима предварительная хроматография (газовая или жидкостная) с дополнительной пробоподготовкой (твердофазной экстракцией или дериватизацией анализируемого вещества). При этом удлиняется время проведения исследования, повышается его себестоимость и снижается привлекательность скрининга.

Достигнутые параметры чувствительности и селективности могут быть улучшены в последующих экспериментах. Во-первых, необходимо устранить аппаратные ограничения масс-спектрометра. При разрешении используемого прибора 5000 невозможно избежать интерференции пиков, что снижает объем получаемой информации и приводит к «маскировке» различий между пробами. Применение доступных в настоящее время масс-спектрометров с разрешением более 100 000 (например, приборов с масс-анализатором типа Orbitrap [23]), в принципе, может решить эту проблему при использовании ионизации ЛОС излучением лазерной плазмы. Однако такие ионные источники не входят в комплект выпускаемых в настоящее время приборов.

Проведенное исследование демонстрирует потенциал анализа волатолама для обнаружения повреждения почек у детей с ВУ. Применение анализа ЛОС образцов без пробоподготовки, в состоянии «как они есть», на наш взгляд, является перспективным направлением, которое при решении технических проблем может обеспечить новое направление в диагностике заболеваний.

Мочевые уровни маркеров воспаления (MCP-1, IL-8, IL-18), ангиогенеза (VEGF) и фиброза (TGF-β1) в группе пациентов с ВУ были значительно повышены, что, по нашему мнению, подтверждало персистенцию патологического процесса в почечной паренхиме. Подобные изменения продемонстрированы рядом исследователей как на доклиническом этапе, так и при исследовании пациентов.

Доклинические исследования показали, что IL-18 является медиатором острого повреждения канальцев по-

чек, индуцируя как нейтрофильную, так и моноцитарную инфильтрацию почечной паренхимы [24]. Также было продемонстрировано, что IL-18 играет важную роль в активации макрофагов [20].

Клетки почечных канальцев увеличивают продукцию MCP-1 в ответ на провоспалительные цитокины [21]. MCP-1 привлекает моноциты крови и тканевые макрофаги к фокусам воспаления посредством взаимодействия с хемокиновым рецептором 2 (CCR2) [22]. Отсутствие корреляции между уровнями MCP-1 в моче и сыворотке позволяет предположить, что MCP-1, обнаруживаемый в моче, локально вырабатывается почками, а не возникает в результате фильтрации из сыворотки крови [21].

В проведенном нами исследовании уровни биомаркера VEGF имели наименьшее различие у группы контроля и группы детей с ВУ. Возможное объяснение этого явления заключается в том, что выработка VEGF зависит не только от степени гипоксии тканей, но и от количества клеток, продуцирующих VEGF в почках [25]. Предположительно прогрессирующее накопление фиброзной ткани и гипоксия могут способствовать повреждению клеток, продуцирующих VEGF в почках, что приводит к снижению общего синтеза и выведения VEGF с мочой [26].

Многочисленные клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о том, что TGF-β1 имеет решающее значение для развития и прогрессирования фиброза почек у пациентов с ХБП различной этиологии, включая ПМП [27]. Зачастую комбинация именно MCP-1 и TGF-β1 выбирается исследователями для оценки состояния почечной паренхимы при различных состояниях. Было установлено, что уровни сывороточных MCP-1 и TGF-β1 у детей при вторичном (на фоне ПМП) и первичном пиелонефрите были соответственно в 2,5 и 2,8 раза выше [28]. По всей видимости, нарушение уродинамики имело определяющее значение в развитии и поддержании воспалительного процесса мочевыводящих путей [29].

Ограничения исследования

Ограничениями исследования являются: небольшая выборка пациентов с достаточно большим разбросом по возрасту, разная степень почечного поврежде-

ния в группе пациентов с ВУ к началу исследования. К технологическим ограничениям можно отнести низкую (5000) разрешающую способность используемого масс-спектрометра, что приводит к интерференции пиков и снижает объем различий между пробами.

Заключение

Новые подходы, основанные на омиксных технологиях, в настоящее время все чаще применяются для анализа биомедицинских объектов как для диагностики, так и для изучения механизмов возникновения патологии. Преимущества данных методов заключаются в возможности одновременного определения большого числа различных веществ, удобстве и экспрессности проведения анализа.

Важный фактор, определяющий эффективность лечения повреждения почек, — стадия, на которой обнаружено заболевание. Известно, что определение единичных показателей не только неинформативно для диагностики заболевания, но и не подходит для своевременной постановки диагноза. В изучении метаболома мочи применяются таргетный метод, ориентированный на поиск и изучение конкретных соединений, и нетаргетный подход, измеряющий большой спектр метаболитов с применением инструментов статистической обработки данных.

В процессе работы был применен нетаргетный анализ масс-спектров ЛОС мочи и сопоставление с результатами исследования креатинина сыворотки крови и СКФ у пациентов с ВУ и без таковых. Для верификации повреждения почек были определены мочевые уровни биомаркеров воспаления, фиброза и ангиогенных факторов. В нашем исследовании использовался времяпролетный масс-спектрометр рефлектрон с квадрупольной транспортной системой, особенностью которого является применение жесткого ультрафиолетового излучения лазерной плазмы, создаваемой импульсным лазерным излучением на поверхности металлической мишени, для ионизации ЛОС при атмосферном давлении. Проведенный дисперсионный анализ показал, что в регистрируемых масс-спектрах существует набор пиков, по которым возможно разделение групп на «дети с повреждением почек» и «дети без повреждения почек». При использовании приборов с более высоким разрешением, характеризующихся зна-

чительно меньшей интерференцией в масс-спектрах, количество таких пиков должно возрастет, что увеличивает надежность получаемых результатов.

Применение для нетаргетного анализа масс-спектров ЛОС мочи без предварительной пробоподготовки, на наш взгляд, является перспективным направлением, которое при решении ряда технических проблем может стать скрининговым методом в ранней диагностике повреждения почек у детей с ВУ, так как позволяет неинвазивно скринировать наличие патологии и многократно исследовать изменения в органе в течение терапии.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Данное исследование поддержано грантом Министерства науки и образования Российской Федерации на создание Научного центра мирового уровня «Фотоника» № 075-15-2022-315.

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Участие авторов. А.Б. Бухарина — разработка дизайна исследования, проведение эксперимента, анализ полученных результатов и написание значительной части финальной версии статьи; А.О. Федулкина — проведение эксперимента, отбор и анализ биоматериала, исследование биомаркеров, участие в написании финальной версии статьи; К.Н. Демидова — набор пациентов, сбор клинических, лабораторных и анкетных данных, участие в написании разделов «Материалы и методы» и «Результаты»; А.В. Пенто — разработка конструкции ионного источника масс-спектрометра, участие в проведении экспериментов и обработке данных, подготовке текста статьи; Л.Д. Мальцева — проведение эксперимента, отбор и анализ биоматериала, исследование биомаркеров, участие в написании финальной версии статьи; Я.О. Симановский — разработка конструкции ионного источника масс-спектрометра, участие в проведении экспериментов и обработке данных, подготовке текста статьи; С.М. Никифоров — разработка основной концепции и дизайна исследования, редактирование статьи; О.Л. Морозова — разработка основной концепции и дизайна исследования, редактирование статьи. Все авторы статьи внесли существенный вклад в организацию и проведение исследования, прочли и одобрили окончательную версию рукописи перед публикацией.

ЛИТЕРАТУРА

- Morris AP, Le TH, Wu H, et al. Trans-ethnic kidney function association study reveals putative causal genes and effects on kidney-specific disease aetiologies. *Nat Commun.* 2019;10(1):29. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07867-7>
- Macioszek S, Wawrzyniak R, Kranz A, et al. Comprehensive Metabolic Signature of Renal Dysplasia in Children. A Multiplatform Metabolomics Concept. *Front Mol Biosci.* 2021;8:665661. doi: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.665661>
- Hajiyev P, Burgu B. Contemporary Management of Vesico-ureteral Reflux. *Eur Urol Focus.* 2017;3(2–3):181–188. doi: <https://doi.org/10.1016/j.euf.2017.08.012>
- Fillion ML, Watt CL, Gupta IR. Vesico-ureteric reflux and reflux nephropathy: from mouse models to childhood disease. *Pediatr Nephrol.* 2014;29(4):757–766. doi: <https://doi.org/10.1007/s00467-014-2761-3>
- Chertin B, Abu Arafah W, Kocherov S. Endoscopic correction of complex cases of vesico-ureteral reflux utilizing Vantris as a new non-biodegradable tissue-augmenting substance. *Pediatr Surg Int.* 2014;30(4):445–448. doi: <https://doi.org/10.1007/s00383-014-3468-z>
- Nickolas TL, Barasch J, Devarajan P. Biomarkers in acute and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008;17(2):127–132. doi: <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3282f4e525>
- Хворостов И.Н., Смирнов И.Е., Кучеренко А.Г., и др. Нефросцинтиграфия и цитокины в диагностике поражений почек при пузырно-мочеточниковом рефлюксе у детей // *Российский педиатрический журнал.* — 2013. — № 2. — С. 20–26. [Khvorostov IN, Smirnov IE, Kucherenko AG, et al. Nephroscintigraphy and cytokines in the diagnosis of kidney lesions in vesico-ureteral reflux in children. *Russian Pediatric Journal.* 2013;2:20–26. (In Russ.)]
- Zhang WR, Parikh CR. Biomarkers of Acute and Chronic Kidney Disease. *Annu Rev Physiol.* 2019;81:309–333. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114605>

9. Drabińska N, Flynn C, Ratcliffe N, et al. A literature survey of all volatiles from healthy human breath and bodily fluids: the human volatilome. *J Breath Res.* 2021;15(3). doi: <https://doi.org/10.1088/1752-7163/abf1d0>
10. Krzemień G, Szmigielska A, Turczyn A, et al. Urine interleukin-6, interleukin-8 and transforming growth factor β 1 in infants with urinary tract infection and asymptomatic bacteriuria. *Cent Eur J Immunol.* 2016;41(3):260–267. doi: <https://doi.org/10.5114/ceji.2016.63125>
11. Konda R, Sato H, Sakai K, et al. Urinary excretion of vascular endothelial growth factor is increased in children with reflux nephropathy. *Nephron Clin Pract.* 2004;98(3):c73–78. doi: <https://doi.org/10.1159/000080676>
12. De Lacy Costello B, Amann A, Al-Kateb H, et al. A review of the volatiles from the healthy human body. *J Breath Res.* 2014;8(1):014001. doi: <https://doi.org/10.1088/1752-7155/8/1/014001>
13. Datta S, Depadilla L. Feature selection and machine learning with mass spectrometry data for distinguishing cancer and non-cancer samples. *Statistical Methodology.* 2006;3(1):79–92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.stamet.2005.09.006>
14. Zoccali M, Tranchida PQ, Mondello L. Fast gas chromatography-mass spectrometry: A review of the last decade. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2019;118:444–452. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.006>
15. Лисица А.В., Пономаренко Е.А., Лохов П.Г., и др. Постгеномная медицина: альтернатива биомаркерам // *Вестник РАМН.* — 2016. — Т. 71. — № 3. — С. 255–260. [Litsitsa AV, Ponomarenko EA, Lohov PG, et al. Postgenomic Medicine: Alternative to Biomarkers. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2016;71(3):255–260. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.15690/vramn647>
16. Pento AV, Nikiforov SM, Simanovsky YO, et al. Laser ablation and ionisation by laser plasma radiation in the atmospheric-pressure mass spectrometry of organic compounds. *Quantum Electronics.* 2013;43(1):55–59. doi: <https://doi.org/10.1070/QE2013v043n01ABEH015065>
17. Pento AV, Bukharina AB, Nikiforov SM, et al. Laser-induced plasma on a metal surface for ionization of organic compounds at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry.* 2021;461:116498. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2020.116498>
18. Smith D, Španěl P. Selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) for on-line trace gas analysis. *Mass Spectrom Rev.* 2005;24(5):661–700. doi: <https://doi.org/10.1002/mas.20033>
19. Krzemień G, Szmigielska A, Turczyn A, et al. Urine interleukin-6, interleukin-8 and transforming growth factor β 1 in infants with urinary tract infection and asymptomatic bacteriuria. *Cent Eur J Immunol.* 2016;41(3):260–267. doi: <https://doi.org/10.5114/ceji.2016.63125>
20. Elner SG, Strieter RM, Elner VM, et al. Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human retinal pigment epithelial cells. *Lab Invest.* 1991;64(6):819–825.
21. Kiyici S, Erturk E, Budak F, et al. Serum monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion molecules in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Arch Med Res.* 2006;37(8):998–1003. doi: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2006.06.002>
22. Gültekin ND, Benzer M, Tekin-Nejmann Ş. Is there any relation between connective tissue growth factor and scar tissue in vesicoureteral reflux? *Turk J Pediatr.* 2019;61(1):71–78. doi: <https://doi.org/10.24953/turkjped.2019.01.011>
23. Eliuk S, Makarov A. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2015;8:61–80. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071114-040325>
24. Boring L, Gosling J, Chensue SW, et al. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest.* 1997;100(10):2552–2561. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI119798>
25. Dimke H, Sparks MA, Thomson BR, et al. Tubulovascular cross-talk by vascular endothelial growth factor a maintains peritubular microvasculature in kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(5):1027–1038. doi: <https://doi.org/10.1681/ASN.2014010060>
26. Morozova O, Morozov D, Pervouchine D, et al. Urinary biomarkers of latent inflammation and fibrosis in children with vesicoureteral reflux. *Int Urol Nephrol.* 2020;52(4):603–610. doi: <https://doi.org/10.1007/s11255-019-02357-1>
27. Wu C-F, Chiang W-C, Lai C-F, et al. Transforming growth factor β -1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte-myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis. *Am J Pathol.* 2013;182(1):118–131. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.09.009>
28. Gültekin ND, Benzer M, Tekin-Nejmann Ş. Is there any relation between connective tissue growth factor and scar tissue in vesicoureteral reflux? *Turk J Pediatr.* 2019;61(1):71–78. doi: <https://doi.org/10.24953/turkjped.2019.01.011>
29. Tokarchuk N, Vyzhga Y, Tokarchuk V, et al. [FIBROTIC MARKERS IN INFANTS WITH PYELONEPHRITIS]. *Georgian Med News.* 2019;(288):44–48.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Морозова Ольга Леонидовна, д.м.н., профессор [*Olga L. Morozova*, MD, PhD, Professor]; **адрес:** 119019, Москва, Никитский бульвар, д. 13, с. 1 [**address:** 13-1, Nikitsky Boulevard, 119019, Moscow, Russia]; **e-mail:** morozova_ol@list.ru, **SPIN-код:** 1567-4113, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-2453-1319>

Бухарина Айгуль Булатовна [*Aygul B. Bukharina*]; **e-mail:** ay15@mail.ru, **SPIN-код:** 3189-1112, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3627-3302>

Федулкина Анастасия Олеговна, студентка [*Anastasia O. Fedulkina*, Student]; **e-mail:** n.fedulkina@mail.ru, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6232-2123>

Демидова Кармина Насимджоновна [*Karmina N. Demidova*]; **e-mail:** negmatova.karmina@mail.ru, **SPIN-код:** 9281-4273, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-4638-6370>

Пенто Андрей Владимирович, к.ф.-м.н. [*Andrei V. Pento*, PhD in Physical and Mathematical Sciences]; **e-mail:** pentan@mail.ru, **SPIN-код:** 6035-3748, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5122-8265>

Мальцева Лариса Дмитриевна, к.м.н., доцент [*Larisa D. Maltseva*, PhD, Assistant Professor]; **e-mail:** lamapost@mail.ru, **SPIN-код:** 7725-2499, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-4380-4522>

Симановский Ярослав Олегович, к.т.н. [*Yaroslav O. Simanovsky*, PhD in Technical Sciences]; **e-mail:** yaroslav@kapella.gpi.ru, **SPIN-код:** 3438-9329, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0779-1135>

Никифоров Сергей Михайлович, к.ф.-м.н. [*Sergei M. Nikiforov*, PhD in Physical and Mathematical Sciences]; **e-mail:** 15925@mail.ru, **SPIN-код:** 9359-0557, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7510-4355>