

УДК 616.612-002, 616.61-008.6, 616.61-002.16, 616-091.8, 616-092.9  
<https://doi.org/10.17816/MAJ19371-82>

## АПРОБАЦИЯ МЕТОДА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВ МОЧИ У КРЫС ПРИ ТОКСИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ

К.В. Сивак<sup>1</sup>, Я.А. Забродская<sup>1,2,3</sup>, О.А. Добровольская<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Минздрава РФ, Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина;

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург

Для цитирования: Сивак К.В., Забродская Я.А., Добровольская О.А. Апробация метода электрофоретического разделения и идентификации некоторых белков мочи у крыс при токсической нефропатии // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19. – № 3. – С. 71–82. <https://doi.org/10.17816/MAJ19371-82>

Поступила: 31.07.2019

Одобрена: 16.08.2019

Принята: 29.08.2019

**Цель исследования.** Целью настоящей работы была апробация метода определения некоторых белковых маркеров в моче крыс методом электрофоретического разделения с последующей масс-спектрометрической идентификацией для раннего выявления нефротоксичности. В задачи исследования входили оценка воспроизводимости метода разделения белков, сравнение белковых профилей мочи в норме и при введении гентамицина сульфата, а также биохимическое и морфологическое исследование биоптатов почек.

**Материалы и методы.** Гентамицина сульфат вводили крысам обоего пола внутримышечно в дозе 60 мг/кг в течение 5 дней. Суточную мочу собирали в день 0, на 3, 7 и 14-е сутки от начала введения гентамицина сульфата в обменных клетках. Измеряли концентрации общего белка и креатинина в пробах мочи, уровень липидов в гомогенатах почек. Электрофоретическое разделение белков мочи проводили в Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis. Гели окрашивали, а окрашенные зоны полиакриламидного геля вырезали и выполняли ферментативный гидролиз белков. Спектры триптических пептидов регистрировали на MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометре ultrafleXtreme (Bruker, Германия). Белки идентифицировали в программе Biotools при обращении к базе данных Mascot ([matrixscience.com](http://matrixscience.com)).

**Результаты.** Оценка воспроизводимости результатов электрофоретического разделения белков мочи крыс показала приемлемую величину коэффициента вариации (в среднем 8,03 %) и погрешности анализа ( $\Delta_{\text{анализа}} = 14,53\%$ ). Было обнаружено, что в норме у крыс-самцов в моче доминирует предшественник альфа-2-уроглобулина, у самок преобладают легкие цепи иммуноглобулина G. На фоне введения гентамицина сульфата в моче у крыс обоих полов появляются лейкоциты в патологических концентрациях; у самцов протеомный профиль характеризуется сильной внутривидовой дисперсией, в том числе за счет спермальной контаминации; у самок наблюдаются хорошо идентифицируемые зоны альбумина, альфа-1-антитрипсина, аминокептидазы M, бета-2-микроглобулина, трансферрина. При биохимическом исследовании гомогенатов почек выявлено увеличение уровня общего холестерина (самцы) и триацилглицеридов (самки). Патоморфологические изменения были схожими у самцов и самок крыс в виде жировой дистрофии нефротелия проксимальных канальцев и лейкоцитарной инфильтрации интерстиция и подтверждали изменения в спектре белков мочи.

**Заключение.** На основании данных исследования было установлено, что технология электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с последующей MALDI-масс-спектрометрической идентификацией и денситометрическим определением доли белковых фракций применима для выявления нефротоксичности. Из-за половых различий в белковом спектре предпочтительно исследовать мочу крыс-самок.

**Ключевые слова:** крысы; нефротоксичность; гентамицин; моча; электрофорез; масс-спектрометрия; PAGE-MALDI-TOF/TOF-идентификация; протеинурия.

## APPROVAL OF THE METHOD OF ELECTROPHORETIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME URINE PROTEINS IN RATS WITH TOXIC NEPHROPATHY

K.V. Sivak<sup>1</sup>, Ya.A. Zabrodskaya<sup>1,2,3</sup>, O.A. Dobrovol'skaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia;

<sup>2</sup> Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC "Kurchatov Institute", Saint Petersburg, Russia;

<sup>3</sup> Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Sivak KV, Zabrodskaya YaA, Dobrovol'skaya OA. Approval of the method of electrophoretic separation and identification of some urine proteins in rats with toxic nephropathy. *Medical Academic Journal*. 2019;19(3):71-82. <https://doi.org/10.17816/MAJ19371-82>

Received: July 31, 2019

Revised: August 16, 2019

Accepted: August 29, 2019

### Список сокращений

ГС — гентамицина сульфат; ПААГ — полиакриламидный гель; MALDI-TOF/TOF — матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетной масс-спектрометрией.

**The aim of the article.** The aim was to test the method for determining certain protein markers in rat urine by electrophoretic separation followed by mass spectrometric identification for early diagnostic of nephrotoxicity. The objectives of the study included assessing the reproducibility of the protein separation method, comparing rats urine protein profiles normal and after gentamicin sulfate administration, as well as a biochemical and morphological study of kidney biopsy specimens.

**Materials and methods.** Gentamicin sulfate (GS) was administered intramuscularly to rats of both sexes at a dose of 60 mg/kg b.w. for consequence 5 days. Daily urine was collected in the background, on the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day from the start of the administration of GS in the metabolic cages. We measured the concentrations of total protein and creatinine in urine samples, the level of lipids in the homogenates of the kidneys. Electrophoretic separation of urine proteins was performed in the Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis. The gels were stained, and the stained zones were excised and enzymatic hydrolysis of the proteins was performed. Spectra of tryptic peptides were recorded on an ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker, Germany). Proteins were identified in the Biotools program by accessing the Mascot database (matrixscience.com).

**Results.** Assessment of reproducibility of the results of electrophoretic separation of rat urine proteins showed an acceptable value of the coefficient of variation (on average 8.03%) and the error of analysis ( $\Delta_{\text{analysis}} = 14.53\%$ ). It that normally in rats of males the alpha-2-uroglobulin precursor dominates in urine and in females immunoglobulin G light chains dominate was show. Against the background of the administration of GS, leukocytes in pathological concentrations appear in the urine in rats of both sexes; in males, the proteomic profile has a strong intraspecific dispersion, including due to sperm contamination; in females, well identified zones of albumin, alpha-1-antitrypsin, aminopeptidase M, beta-2-microglobulin, and transferrin was appear. A biochemical study of kidney homogenates an increase in total cholesterol (males) and triacylglycerides (females) revealed. Pathomorphological changes were similar in male and female rats in the form of fatty degeneration of the proximal tubule nephrothelium and leukocyte infiltration of interstitium and confirmed changes in the spectrum of urine proteins.

**Conclusion.** Based on the analysis of the experimental results it was found that the use of the technology of electrophoretic separation of proteins in PAGE under denaturing conditions followed by MALDI mass spectrometric identification (PAGE-MALDI-TOF/TOF) and densitometric determination of the percentage of protein fractions is applicable for the detection of nephrotoxicity. Due to gender differences in the protein spectrum it is preferable to examine the urine of female rats. Pathomorphological changes did not have gender differences.

**Keywords:** rats; nephrotoxicity; gentamicin; urine; PAGE-MALDI-TOF/TOF; proteinuria.

## Введение

Ранняя диагностика поражения почек представляет собой одну из важных задач токсикологии. Нефротоксичность химических веществ и лекарственных препаратов проявляется в способности вызывать структурные и функциональные нарушения почек. Фуросемид, ванкомицин и гентамицин являются наиболее часто назначаемыми нефротоксичными препаратами пациентам, находящимся в критическом состоянии в результате развития острого повреждения почек [1]. Нефротоксичность аминогликозидных антибиотиков, в особенности неомицина и гентамицина, проявляется повреждением различных структур нефрона почек [2]. Передозировка аминогликозидами, оказывающими мембранотоксическое действие в митохондриях и лизосомах нефротелиоцитов, приводит к накоплению ламеллярных включений внутри лизосом, а затем разрушению клеток почечных канальцев. Нефротоксичные вещества или лекарственные препараты повреждают клетки почек, такая ситуация может разрешиться восстановлением их целостности, гибелью или апоптозом. Молекулярными «свидетелями» токсического воздействия могут быть некоторые белки, попадающие в мочу. Недавнее изучение пептидома мочи человека позволило идентифицировать 561 плазменный и 1461 мочевой эндогенный пептид. Только 90 пептидов были обнаружены как в моче, так и в плазме. При этом при сравнении этих общих пепти-

дов не выявлено значимой корреляции между плазменными и мочевыми пептидами, за исключением фрагментов коллагена в моче из-за потенциального селективного исключения этих RGD-пептидов из канальцевой реабсорбции. Большинство же плазменных пептидов не обнаружено в моче из-за их канальцевой реабсорбции [3]. Однако большая часть других мочевых пептидов на самом деле имеет истинно почечное происхождение и может быть использована в качестве биомаркеров нефротоксичности.

**Целью** настоящей работы была апробация методического подхода определения некоторых белковых маркеров в моче крыс методом электрофоретического разделения с последующей масс-спектрометрической идентификацией как метода ранней диагностики токсической нефропатии. В задачи исследования входили: оценка воспроизводимости метода разделения белков, сравнение белковых профилей мочи в норме и при введении крысам гентамицина сульфата (ГС), определение динамики содержания некоторых белков в моче крыс, а также проведение биохимического и морфологического исследования почек.

## Материалы и методы исследования

Эксперименты на животных выполняли в соответствии с требованиями этического обращения с лабораторными животными [4]

и протоколом № НИР-102-НТ/16 (22.11.2016) отдела доклинических исследований в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Аутбредные крысы массой тела 200–220 г (возраст — 18 нед.), полученные из филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», были разделены по 6 особей каждого пола на группы: группу контроля (6 самцов и 6 самок интактных крыс) и опытную группу (6 самцов и 6 самок крыс, получавших нефротоксин). Моделировали экспериментальное отравление животных аминокликозидным антибиотиком ГС (Sigma-Aldrich, G1264, CAS Number 1405-41-0), который в токсических дозах является прямым нефротоксином (60 мг/кг внутримышечно 5 дней подряд). На 15-е сутки выполняли запланированную эвтаназию животных под наркозом (ксилазин, 10 мг/кг + тилетамин-золазепам, 50 мг/кг) путем тотального забора крови при декапитации. Почки из забрюшинного пространства выделяли при вскрытии для биохимического и патоморфологического исследования.

**Анализ мочи.** Суточную мочу собирали в день 0 до введения ГС, на 3, 7 и 14-е сутки от начала введения ГС в обменных клетках Tecniplast Gazzada (Италия) с добавлением в качестве ингибитора протеолиза консерванта ProClin-300 (5 мкл на 10 мл мочи). Консервант не влиял на аналитические характеристики методов, использованных в анализе мочи. В моче определяли содержание общего белка (по связыванию пирогаллолового красного), креатинина (методом Яффе) и рассчитывали соотношения белок — креатинин (мг/г креатинина) на анализаторе UriSCAN-БК (ООО «Эйлитон», Россия); оценивали уровень лейкоцитов — микроскопически с подсчетом числа клеток в слайд-планшетах при их суправитальной окраске [5].

**Электрофоретическое разделение.** Образцы мочи по 5 мкл смешивали с буфером Лэммли и проводили термическую денатурацию в присутствии бета-меркаптоэтанола. Образцы в объеме 10 мкл наносили в лунки полиакриламидного геля (ПААГ, 12 % разделяющего геля и 5 % концентрирующего). Электрофоретическое разделение белков выполняли согласно [6] при 220 В и 25 мА в ячейке Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis. Гели окрашивали коллоидным раствором Кумасси, получали изображения на системе документирования гелей ChemiDoc MP System (BioRad, США). Относительную концентрацию белковых фракций в геле рассчитывали в процентах, считая интенсивность окраски совокупности всех выявленных полос за 100 %, и со-

относили с общим содержанием белка в моче. Вариабельность электрофоретических анализов оценивали путем расчета стандартного отклонения и коэффициента вариации показателей интенсивности белковых полос на электрофореграмме в восьми повторностях. После окрашивания получали изображения на системе документирования гелей ChemiDoc MP System. Денситометрический анализ белковых фракций проводили с использованием программы ImageLab. Детекцию белковых полос осуществляли в автоматическом режиме. Молекулярный вес по величине пробега определяли с помощью стандартных маркеров молекулярных масс (Bio-Rad). Далее оценивали процентное соотношение белковых полос в образце белков мочи крыс в восьми повторностях по интенсивности белкового пятна на ПААГ (Volume).

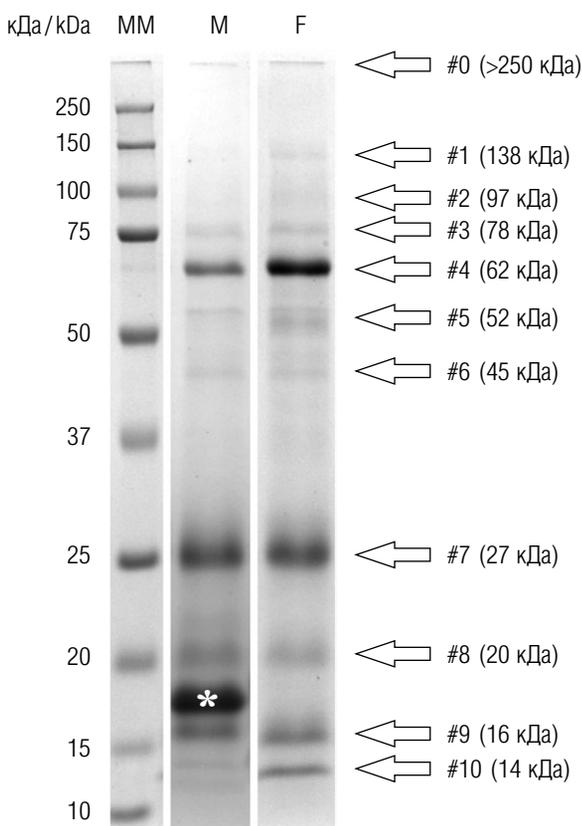
**Масс-спектрометрическая идентификация белков.** Метод применяли для идентификации белков мочи крыс. Выбранные окрашенные зоны ПААГ вырезали и проводили ферментативный гидролиз белков в геле трипсином [7]. Образцы смешивали с матрицей HCCA (Bruker), наносили на мишень GroundSteel и высушивали. Спектры триптических пептидов регистрировали на MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометре ultrafleXtreme (Bruker). На каждый масс-спектр суммировали 3000 импульсов лазера. Белки идентифицировали в программе Biotools при обращении к базе данных Mascot (matrixscience.com). Погрешность ограничивали 20 ppm (мг/л). Идентификацию считали достоверной, если величина Score превышала пороговое значение ( $p < 0,05$ ).

**Определение липидов.** На 15-е сутки эксперимента из контрольных и опытных групп крыс получали гомогенаты сырой ткани почек 1 : 20 (масса/объем) в 100 % изопропанол в гомогенизаторе Поттера при температуре тающего льда. Гомогенаты центрифугировали при 10 000 g 5 мин и в супернатанте определяли уровень общего холестерина (Fluitest CHO, Analyticon), триацилглицеридов (Fluitest TRI, Analyticon) и общих фосфолипидов (DiaSys Phospholipids FS) на автоматическом биохимическом анализаторе KeyLab (BPC+Biosed s.r.l., Италия).

**Гистологическое исследование.** Для патоморфологического исследования после запланированной эвтаназии животных в конце эксперимента (на 15-е сутки) из правой и левой почек брали биоптат длиной 8 мм и диаметром 1 мм с помощью иглы для биопсии, кассетировали и фиксировали в 10 % нейтральном забуференном растворе формалина не менее 48 ч. Затем выполняли стандартную

проводку и заливку в парафиновые блоки, из которых получали срезы толщиной 5 мкм [8]. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали под светооптическим микроскопом Leica DM1000. Микрофотографии получали с помощью камеры и программы ADF Image Capture (версия x64, 4.7.14011).

**Оценка воспроизводимости.** Для определения воспроизводимости проводили внутри- и межсерийную оценку коэффициента вариации при разделении в восьми повторностях образцов мочи. Получив данные всех восьми повторностей, мы рассчитали стандартное отклонение и коэффициент вариации. Совокупную величину погрешности вычисляли исходя из влияния степени чистоты посуды и реактивов, точности дозирования пипеткой, параметров приборов (ГОСТ Р 53133.1-2008.



**Рис. 1.** Определяемые зоны типовой ПААГ-электрофореграммы белков мочи крыс (М — самцы и F — самки) и их молекулярные массы (кДа). MM — маркер молекулярных масс (Bio-Rad). \* обозначен характерный для самцов предшественник альфа-2-уроглобулина или главный мочевого белок; # — порядковый номер пробы

**Fig. 1.** The determined zones of the PAGE-electrophoregrams of rat urine proteins (M — males and F — females) and their molecular weights (kDa). MM is a molecular weight marker (Bio-Rad). \* the alpha-2u-globulin precursor or major urinary protein characteristic of males is indicated; # — number of sample

Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях).

**Статистическая обработка данных.** Данные обрабатывали с использованием пакета статистических программ GraphPad Prism 6.0 (США). Для регистрируемых количественных переменных рассчитывали параметры описательной статистики. Данные представлены в виде среднего значения (*Mean*) и его ошибки ( $\pm SEM$ ), 95 % доверительного интервала (95 % ДИ). Отличия между выборками оценивали с помощью непараметрического критерия Краскела — Уоллиса и Данна для множественных сравнений и считали значимыми при уровне  $p < 0,05$ . В итоговых таблицах при сравнении групп между собой под средними значениями и их ошибками приведены величины уровня значимости, обозначаемые как  $p_{0-14}$  — уровень значимости между сроками воздействия на сутки 0 и 14-е сутки,  $p_{7-14}$  — уровень значимости между 7-ми и 14-ми сутками.

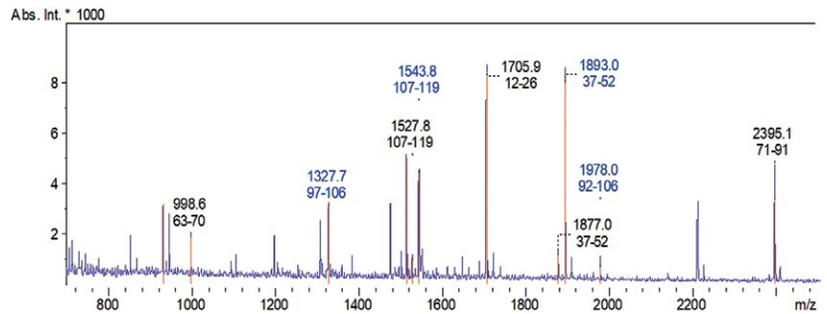
## Результаты и обсуждение

На обзорных электрофореграммах белковых фракций мочи при разделении в ПААГ в денатурирующих условиях были выделены потенциально интересующие нас зоны, соответствующие белкам с различными молекулярными массами. Схема расположения зон представлена на рис. 1.

Величина внутрисерийного коэффициента вариации для разделения белков методом электрофореза составляла от 5,9 % (при значительных количествах белка в моче) до 11,3 % (при низком содержании белка в моче). Межсерийный коэффициент вариации составлял в среднем 7,9 %, что приемлемо для аналитических методов клинической лабораторной диагностики.

Наличие белка в моче у «здоровых» крыс считается нормальным, причем у самцов уровень протеинурии выше, чем у самок. Исследование белков мочи «здоровых» крыс из контрольных групп показало различия в доминировании определенных белков у самцов и самок, связанные с их биологическими функциями. Половые различия проявлялись в превалировании у самцов в моче предшественника альфа-2-уроглобулина как мажорного белкового компонента с молекулярной массой 19 кДа (обозначено \* на рис. 1). Данный белок синтезируется в печени крыс самцов и выполняет функцию феромонсвязывающего

**Рис. 2.** Фрагмент масс-спектра триптических пептидов (сверху), по которому достоверно идентифицировали белок — предшественник альфа-2-уроглобулина (*Rattus norvegicus*), Score = 135 (пороговое значение 92). Отмечены ионы и соответствующие им номера аминокислотных остатков. Предполагаемые последовательности пептидов, а также их масса и погрешность представлены снизу



**Fig. 2.** Fragment of the mass spectrum of tryptic peptides (top), which reliably identified the protein alpha-2u globulin precursor (*Rattus norvegicus*), Score = 135 (threshold value 92). Ions and the corresponding numbers of amino acid residues are noted. The estimated sequences of the peptides, as well as their mass and error are presented below

Start	End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
12	26	1705.9199	1704.9126	1704.8947	10.5	1	K.LNGDWFSTVVASNKR.E
37	52	1876.9633	1875.9561	1875.9553	0.40	0	K.VFMQHIDVLENSLGFK.F
37	52	1892.9534	1891.9461	1891.9502	-2.19	0	K.VFMQHIDVLENSLGFK.F + Oxidation (M)
63	70	998.5715	997.5643	997.5484	15.9	0	R.ELYLVAYK.T
71	91	2395.1201	2394.1128	2394.0903	9.38	0	K.TPEDGEYFVEYDGGNFTFIILK.T
92	106	1977.9504	1976.9432	1976.9455	-1.16	1	K.TDYDRYVMFHLINEK.N + Oxidation (M)
97	106	1327.7017	1326.6944	1326.6795	11.3	0	R.YVMFHLINEK.N + Oxidation (M)
107	119	1527.7774	1526.7701	1526.7551	9.80	0	K.NGETFQMLVLYGR.T
107	119	1543.7614	1542.7541	1542.7501	2.62	0	K.NGETFQMLVLYGR.T + Oxidation (M)

белка, гидрофобный «карман» молекул которого связывает низкомолекулярные пахучие вещества (1-хлордекан и 2-метил-N-фенил-2-пропенамид) и играет роль своеобразного «депо». Неселективное связывание этим белком лимонен-1,2-эпоксида объясняет развитие гиалиновокапельной дистрофии нефротелия канальцев почек самцов крыс при отравлении лимоненом [9, 10]. Мы достоверно идентифицировали белок как предшественник альфа-2-

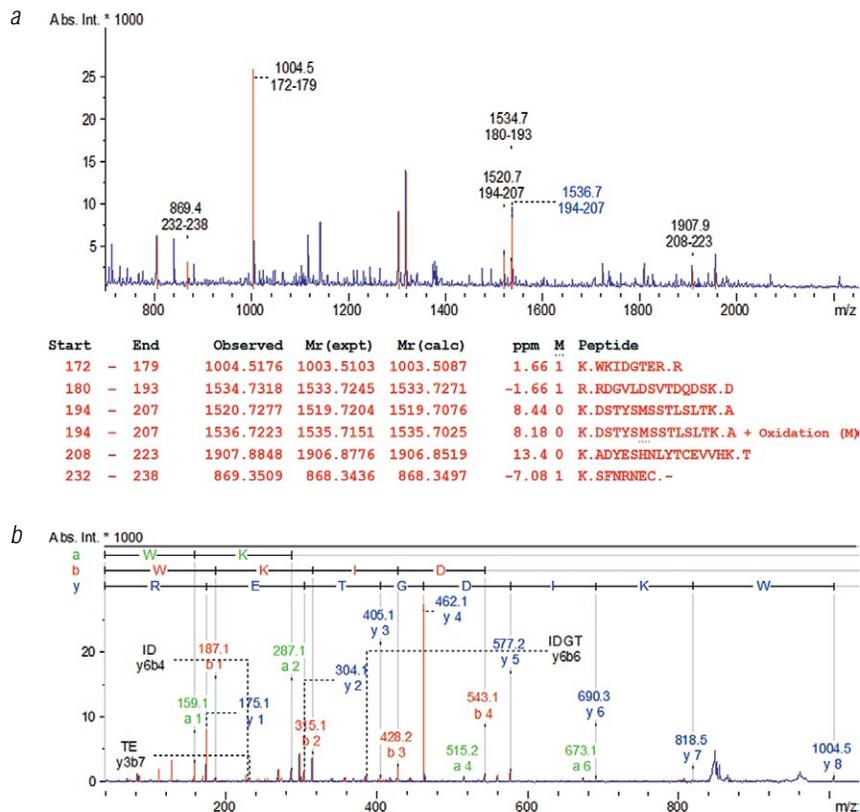
уроглобулина (*Rattus norvegicus*), фрагмент его масс-спектра представлен на рис. 2.

У «здоровых» самок крыс в моче основным компонентом белкового профиля мочи являются легкие цепи иммуноглобулина G с молекулярной массой 28 кДа, который синтезируется плазматическими клетками. Белок был достоверно идентифицирован как легкие цепи иммуноглобулинов (каппа) (*Rattus norvegicus*). Масс-спектр белка с выявленными пептидами

Таблица 1 / Table 1

**Содержание общего белка, величина диуреза и соотношение белок – креатинин в моче крыс на 0, 3, 7 и 14-е сутки токсической нефропатии (n = 6, Mean ± SEM)**  
**The total protein, urine volume and protein-to-creatinine ratio (P/C-ratio) in rat urine samples at 0, 3, 7 and 14<sup>th</sup> days of toxic nephropathy (n = 6, Mean ± SEM)**

Показатель	Сроки, сут	Самцы	Самки
Общий белок мочи, мг/дл	0	108,6 ± 25,5	48,0 ± 12,3
	3-и	185,5 ± 7,4	118,8 ± 15,6
	7-е	133,8 ± 30,5	28,1 ± 6,1
	14-е	279,8 ± 29,8 <i>p</i> <sub>0-14</sub> = 0,0023 <i>p</i> <sub>7-14</sub> = 0,0174	194,3 ± 14,9 <i>p</i> <sub>0-14</sub> = 0,0057 <i>p</i> <sub>7-14</sub> = 0,0005
Объем суточной мочи, мл/сут	0	16,3 ± 3,4	11,5 ± 2,9
	3-и	12,5 ± 0,9	13,7 ± 2,7
	7-е	11,8 ± 1,4	10,2 ± 1,8
	14-е	9,5 ± 0,8	9,2 ± 1,3
Соотношение белок – креатинин, мг/г	0	1145,0 ± 232,4	358,7 ± 40,6
	3-и	1985,0 ± 205,3	1189,0 ± 177,4
	7-е	1655,0 ± 372,1	390,2 ± 41,8
	14-е	2289,0 ± 193,1 <i>p</i> <sub>0-14</sub> = 0,0101	1976,0 ± 240,5 <i>p</i> <sub>0-14</sub> = 0,0012 <i>p</i> <sub>7-14</sub> = 0,0101



**Рис. 3.** Фрагмент масс-спектра триптических пептидов, по которому достоверно идентифицировали легкие цепи иммуноглобулинов (каппа) (*Rattus norvegicus*), Score = 78 (пороговое значение — 72) (a). Отмечены ионы и соответствующие им номера аминокислотных остатков. В таблице представлены предполагаемые последовательности пептидов, а также их масса и погрешность. Спектр фрагментации иона 1004.52 достоверно идентифицирован как легкие цепи иммуноглобулинов (каппа) (*Rattus norvegicus*), Score = 46 (порог 42), последовательность WKIDGTER (b)

**Fig. 3.** Fragment of the mass spectrum of tryptic peptides by which the Ig kappa chain (*Rattus norvegicus*) protein was reliably identified, Score = 78 (threshold value 72). Ions and the corresponding numbers of amino acid residues are noted (a). The table shows the expected sequences of the peptides, as well as their mass and error. The fragmentation spectrum of ion 1004.52, reliably identified as Ig kappa chain (*Rattus norvegicus*), Score = 46 (threshold 42), sequence WKIDGTER (b)

представлен на рис. 3, a. Для повышения достоверности идентификации зарегистрировали спектр фрагментации иона 1004.52, который также принадлежал легким цепям иммуноглобулинов. Результаты идентификации иллюстрирует рис. 3, b. Данный белок представляет собой аналог белка Бенс-Джонса у человека, который появляется в больших количествах в моче при множественной миеломе и относится к классу парапротеинов.

Суточный объем мочи (диурез) от момента начала введения нефротоксина до 14-х суток имел тенденцию к снижению как проявление формирования олигурической фазы острого повреждения почек. Результаты определения общего белка, величины суточного диуреза и соотношения белок — креатинин при воздействии ГС на крыс представлены в табл. 1. Общее выделение белка с мочой крыс за сутки в различные временные интервалы после введения нефротоксина для самцов на день 0 составило

14,4 ± 3,1 мг/сут (95 % ДИ 6,3–22,5 мг/сут), на 3-и сутки — 23,3 ± 2,3 мг/сут (95 % ДИ 17,5–29,2 мг/сут), на 7-е сутки — 13,9 ± 0,9 мг/сут (95 % ДИ 11,6–16,1 мг/сут), на 14-е сутки — 26,3 ± 3,3 мг/сут (95 % ДИ 17,9–34,6 мг/сут); уровень значимости  $p = 0,0055$  по критерию Краскела — Уоллиса; при множественном сравнении по критерию Данна достоверных различий между сравниваемыми сроками воздействия не установлено, за исключением на день 0 и 14-е сутки ( $p = 0,0292$ ). У самок выделение белка с мочой крыс за сутки на день 0 составило 4,0 ± 0,4 мг/сут (95 % ДИ 2,9–5,1 мг/сут), на 3-и сутки — 15,0 ± 2,4 мг/сут (95 % ДИ 8,9–21,0 мг/сут), на 7-е сутки — 2,4 ± 0,4 мг/сут (95 % ДИ 1,4–3,4 мг/сут), на 14-е сутки — 16,9 ± 1,5 мг/сут (95 % ДИ 13,1–20,7 мг/сут); уровень значимости  $p = 0,0003$  по критерию Краскела — Уоллиса; при множественном сравнении по критерию Данна достоверные различия установлены между сроками 3-и и 7-е сут-

ки ( $p = 0,0042$ ) и 7-е и 14-е сутки ( $p = 0,0017$ ). Соотношение белок – креатинин, нормализованное в отношении влияния колебаний диуреза, у самцов крыс статистически отличалось на 14-е сутки в 2 раза по сравнению с сутками 0 ( $p = 0,01$ ), а у самок – на 14-е сутки в 5,5 раза по сравнению с 0 сутками ( $p = 0,0012$ ) и 7-ми сутками ( $p = 0,01$ ).

При моделировании токсической нефропатии в моче были идентифицированы и количественно определены некоторые белки, появление которых в ранние сроки можно рассматривать в качестве маркеров нефротоксичности и свидетельствует о возможной их локализации в ткани почек крыс или происхождении. В составе белков мочи крыс-самцов отмечали сильно выраженные разнонаправленные изменения в дни эксперимента, в том числе за счет высокого фонового уровня белка в суточной моче, а также появления простатспецифических антигенов, спермальных ферментов, что не позволило оценить динамику этих белков, вероятно, из-за токсического действия гентамицина, в том числе на функцию половых органов крыс-самцов, либо изменения их полового поведения. У самок с низким уровнем белка в суточной моче до воздействия токсином (0 день) была установлена следующая динамика белкового профиля (табл. 2). Белок аминоксипептидаза М (зона #1<sup>1</sup>, лейцинаминопептидаза) и предшественник уромодулина (зона #2, предшественник белка Тамма – Хорсфалла [11]) достоверно идентифицированы и количественно определялись в моче только на 14-е сутки после введения нефротоксина. Концентрация сывороточного трансферрина (зона #3) и альбумина (зона #4) прогрессивно увеличивалась к 14-м суткам эксперимента. Альфа-1-антитрипсин (зона #5, синтезируется в печени) и предшественник альфа-1-кислого гликопротеина (зона #6, предшественник орозомукоида, который синтезируется в ответ на воспаление тканей) в существенных концентрациях в моче также появлялись ко второй неделе опыта. Максимум уровня легких цепей иммуноглобулинов и бета-2-микроглобулина (входит в состав главного комплекса гистосовместимости) в моче приходился на 3-и и 14-е сутки эксперимента. Некоторое снижение уровня этих двух белков на 7-е сутки опыта связывали с развитием полиурии в данный период и очень низким уровнем общего белка в образцах мочи. Данные белки в норме присутствуют в незначительных концентрациях и активно реабсорбируются эпителием проксимальных канальцев почек. При воздействии нефроток-

сина ГС функция реабсорбции существенно нарушалась, что приводило к выделению данных белков с мочой в больших количествах.

Данные о концентрации некоторых белков в моче крыс, определенные денситометрически, приведены для наглядной демонстрации ее изменения при экспериментальном воздействии нефротоксических веществ в табл. 2. Такой анализ может быть применен только при условии сравнения содержания белков в интактных и экспериментальных группах крыс, поскольку, несмотря на то что интенсивность окрашивания Кумасси пропорциональна концентрации белка, она не одинаково эффективна для различных белков. Для точного определения концентрации белка денситометрически необходимы стандарты для каждого отдельного белка, что существенно усложняет анализ и не является целью настоящего исследования.

В данной работе мы предлагаем использовать метод электрофоретического разделения белков с последующей масс-спектрометрической идентификацией для изучения профиля и динамики содержания некоторых белков в моче крыс при исследовании влияния нефротоксических веществ.

Следует отметить, что наряду с протеинурией у крыс отмечали увеличение количества лейкоцитов (рис. 4), что может косвенно отражаться на интерпретации результатов определения легких цепей иммуноглобулинов методом PAGE-MALDI-TOF/TOF. Более четкую динамику лейкоцитурии отмечали у самцов крыс, где точки увеличения приходились на 7-е и 14-е сутки опыта ( $p = 0,0017$  по критерию Краскела – Уоллиса). Результаты множественных сравнений по критерию Данна у самцов показали достоверные различия между значениями в день 0 и на 14-е сутки, а также между 3-ми и 14-ми сутками эксперимента. У самок лейкоцитурия клинически значимо увеличивалась только на 14-е сутки ( $p = 0,0029$  по критерию Краскела – Уоллиса) и достоверные различия отмечены по сравнению с днем 0, 3-ми и 7-ми сутками опыта по критерию Данна.

Для гентамицина характерно нарушение липидного обмена в почках [2]. При помощи биохимического исследования уровня липидов в гомогенатах почечной ткани крыс были выявлены различия в уровне общего холестерина (у самцов) и триацилглицеридов жирных кислот (у самок) при воздействии гентамицина. Результаты представлены в табл. 3. Однако мы не обнаружили достоверного повышения уровня фосфолипидов, которое описывают зарубежные авторы [12], вероятно, из-за сильной

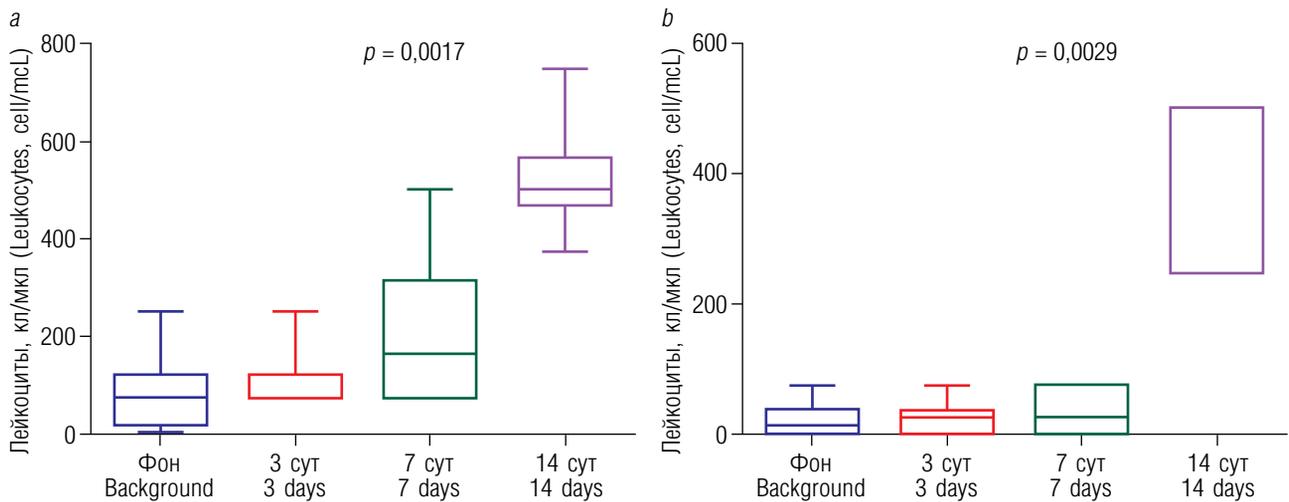
<sup>1</sup> # — порядковый номер пробы.

Таблица 2 / Table 2

Относительное содержание некоторых идентифицированных белков мочи крыс (%), рассчитанное денситометрически на Gel Doc™ EZ  
 The relative concentration of some identified rat urine proteins (%) calculated by densitometry on Gel Doc™ EZ

Номер зоны	Белок <sup>1</sup>	Молекулярная масса, кДа <sup>2</sup>	Самка F#8, сутки				Самка F#9, сутки				Самка F#10, сутки			
			0	3-и	7-е	14-е	0	3-и	7-е	14-е	0	3-и	7-е	14-е
—	Общий белок в образце, мг/дл	—	21,6	88,5	6,13	160	40,6	137	25,3	185	47,1	130	28,2	180
0	Агрегаты белков, %	> 250	2,85	2,14	3,29	1,20	3,36	1,55	2,50	2,81	1,68	1,99	1,48	4,75
1	Аминопептидаза M, %	138	0	0	0	0,64	0	0	0	1,23	0	0	0	0,88
2	Уромодулина предшественник, %	97	0	0	0	0,74	0	0	0	0,79	0	0	0	0,65
3	Трансферрин сывороточный, %	78	2,56	1,41	1,85	1,59	2,18	1,24	2,74	2,41	1,93	1,18	2,19	1,48
4	Альбумин сывороточный, %	62	4,80	5,50	8,69	29,01	6,29	5,47	17,20	26,79	8,85	8,84	11,58	32,87
5	Альфа-1-антитрипсин, %	52	1,00	1,92	2,03	4,66	0,73	1,48	2,72	5,40	1,59	1,12	2,21	4,95
6	Альфа-1-кислого гликопротеина предшественник, %	45	0	0	0	1,13	0	0	0	1,34	0	1,64	0,67	0,90
7	Легкие цепи иммуноглобулинов (каппа), %	27	50,98	45,51	46,89	33,35	27,24	33,38	36,80	28,49	33,58	43,68	0	25,75
8	Неустановленный пептид 2, %	20	17,16	13,68	15,23	6,30	25,08	17,53	16,93	11,34	24,42	15,70	38,47	9,16
9	Неустановленный пептид 1, %	16	16,46	21,21	22,03	14,18	27,94	27,03	21,10	12,10	25,16	21,92	21,73	12,00
10	Бета-2-микроглобулин, %	14	4,19	8,63	0	7,20	7,18	12,32	0	7,31	2,78	3,92	21,67	6,60

Примечание: <sup>1</sup> предполагаемый белок, совпадающий по молекулярной массе на электрофореграмме, ранее идентифицированный масс-спектрометрически по электрофорезу крысиной мочи; <sup>2</sup> молекулярная масса зоны на электрофореграмме мочи крыс при воздействии гентамицином; # — порядковый номер пробы.



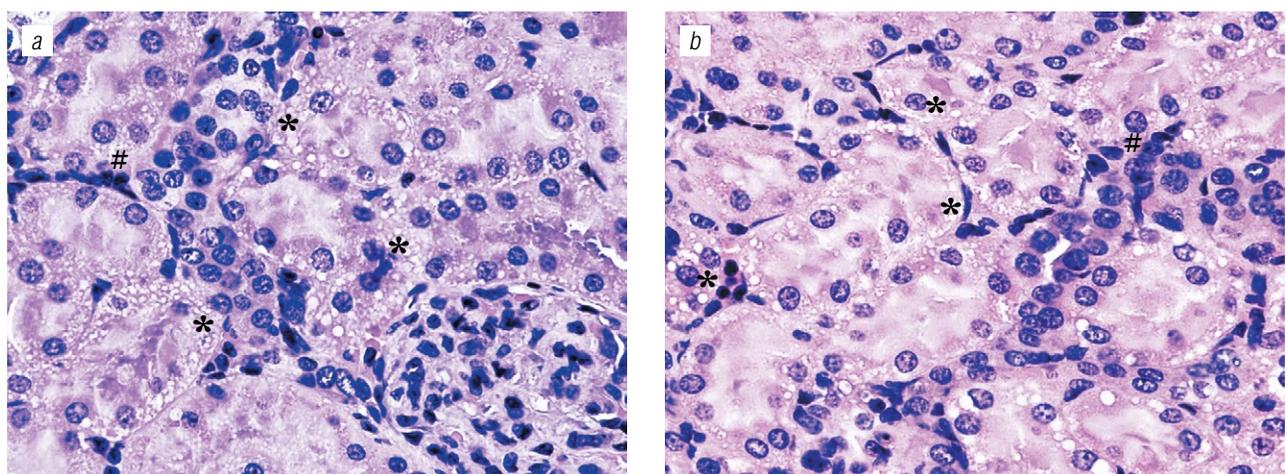
**Рис. 4.** Динамика лейкоцитурии у крыс, получавших гентамицина сульфат (*a* — самцы, *b* — самки крыс)  
**Fig. 4.** Dynamics of leukocyturia in rats treated with gentamicin sulfate (*a* — males, *b* — female rats)

Таблица 3 / Table 3

**Содержание липидов в гомогенатах почечной ткани крыс при воздействии гентамицина сульфата  
 (n = 6, Mean ± SEM)**

**Lipid contents in rat kidney tissue homogenates exposed to gentamicin sulfate (n = 6, Mean ± SEM)**

Показатели	Самцы	Самки
Общий холестерин, ммоль/г: – контрольная группа; – группа гентамицина сульфата 60 мг/кг	9,63 ± 0,23 11,93 ± 0,45, <i>p</i> = 0,0236	11,85 ± 0,50 11,82 ± 0,56
Триацилглицериды, ммоль/г: – контрольная группа; – группа гентамицина сульфата 60 мг/кг	5,53 ± 0,69 8,53 ± 0,76	5,48 ± 0,44 9,53 ± 0,65, <i>p</i> = 0,0291
Фосфолипиды общ., ммоль/г: – контрольная группа; – группа гентамицина сульфата 60 мг/кг	47,20 ± 1,48 48,97 ± 1,05	47,12 ± 1,58 50,77 ± 1,34



**Рис. 5.** Патоморфологические изменения в почке у самцов (*a*) и самок (*b*) крыс после воздействия гентамицином. \* жировая дистрофия нефроэпителия; # лейкоцитарная инфильтрация интерстиция. Парафиновые срезы, окраска гематоксилином и эозином, увеличение ×400

**Fig. 5.** Pathomorphological changes in the kidney in male (*a*) and female (*b*) rats after exposure to gentamicin. \* fatty degeneration of the nephroepithelium; # leukocyte infiltration of interstitium. Paraffin sections, hematoxylin and eosin staining, x400 magnification

внутригрупповой дисперсии, так как в нашем в опыте были использованы нелинейные животные.

Наиболее достоверно токсическое повреждение почек в клинике устанавливают при гистологическом изучении нефробиопсийного материала. При патоморфологическом исследовании биоптатов почек крыс были выявлены умеренная средне- и мелкокапельная жировая дистрофия нефротелия проксимальных канальцев, гиперхроматоз ядер и цилиндры в просветах канальцев преимущественно в корковом слое почек у самцов и самок в одинаковой степени. Среди других признаков нефротоксичности отмечали активацию интерстициальных клеток, умеренную инфильтрацию лейкоцитами коркового вещества почек. Изменения со стороны клубочков обнаружены не были. Данные представлены на рис. 5.

### Закключение

Обнаружены половые различия в составе белков мочи крыс самцов и самок. Анализ результатов электрофореза мочи здоровых крыс показал, что в моче самцов доминирующим белком является предшественник альфа-2-уроглобулина, относящийся к основным белкам млекопитающих, в моче самок — легкие цепи иммуноглобулинов. Клинического значения предшественник альфа-2-уроглобулина для диагностики нефротоксичности у человека не имеет, так как не синтезируется в организме человека, но играет роль в патогенезе токсической нефропатии у грызунов.

Введение ГС в качестве эталонного прямого нефротоксина, моделирующего токсическую нефропатию в эксперименте и поражающего нефротелий проксимальных канальцев, приводило к повышению уровня лейкоцитов и выделению белка с мочой (рутинные показатели для оценки нефротоксичности и повреждения почек), увеличению содержания липидов в ткани почек (общего холестерина у самцов и триацилглицеридов жирных кислот у самок). Данные биохимического анализа мочи подтверждены результатами гистологического исследования биоптатов почек. Патоморфологические изменения не имели половых различий.

С помощью технологии исследования белковых фракций мочи методом их электрофоретического разделения в ПААГ с последующей идентификацией времяпролетной масс-спектрометрии была установлена динамика определенных фракций некоторых белков, которые могут выступать в качестве маркеров нефротоксичности при изучении механизмов

токсичности новых веществ и прогнозирования риска нефротоксичности лекарственных препаратов.

Из-за сильной внутригрупповой дисперсии и фонового высокого уровня общего белка в моче крыс-самцов не удалось проанализировать динамику некоторых белковых маркеров, главным образом по причине появления спермальных и простатических белков в моче при нахождении крыс в обменных клетках. Вероятно, что при катетеризации мочевого пузыря возможно получение более чистых образцов мочи для исследования, но при проведении доклинических исследований нефротоксичности вследствие инвазивности и травматичности процедуры это сделать затруднительно. В противоположность этому в моче крыс-самок содержание общего белка на день 0 и у интактных животных достаточно низкое, а белковый спектр ограничивается легкими цепями иммуноглобулина. При воздействии на самок ГС в моче были идентифицированы следующие белки: аминопептидаза М (0,6–1,2 %), альбумин (4,8–32,6 %), трансферрин (0,1–4,5 %), альфа-1-антитрипсин (0,1–10,0 %), прекурсор альфа-1-кислого гликопротеина (0,2–2,5 %), прекурсор уромодулина (1,1–1,5 %), бета-2-микроглобулин (0,9–16,9 %) и ряд других, включая два неуставленных пептида с молекулярной массой 16 и 20 кДа. Выявленные белковые маркеры в моче крыс-самок при воздействии ГС свидетельствовали о нарушении реабсорбционной способности канальцевого эпителия, что соотносилось с величиной лейкоцитурии, уровнем липидов в ткани почек и патоморфологическими признаками поражения канальцев.

По результатам оценки прецизионности метода разделения белков мочи крыс при помощи электрофореза в ПААГ было обнаружено увеличение содержания общего белка при патологии: коэффициент вариации (CV) существенно снижался, достигая значения 5 %; общая аналитическая погрешность ( $\Delta_{\text{анализа}}$ ) метода электрофоретического разделения белков мочи составила 14,53 %.

Таким образом, метод электрофоретического разделения белков в ПААГ с последующей MALDI-масс-спектрометрической идентификацией белков применим для исследования нефротоксичности и характеризуется приемлемым уровнем общей аналитической погрешности. Предпочтительно исследовать мочу крыс-самок из-за низкого содержания белков в норме. Повышение уровня некоторых белков в моче крыс соотносилось с величиной лейкоцитурии и гистопатологическими изменениями.

## Дополнительная информация

**Финансирование.** Исследование не имело финансовой поддержки.

**Соблюдение этических норм.** Выполнение исследования одобрено протоколом этического комитета № НИР-102-НТ/16 (22.11.2016) отдела доклинических исследований в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

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

## Литература

- Slater MB, Gruneir A, Rochon PA, et al. Identifying high-risk medications associated with acute kidney injury in critically ill patients: a pharmacoepidemiologic evaluation. *Paediatr Drugs*. 2017;19(1):59-67. <https://doi.org/10.1007/s40272-016-0205-1>.
- Сивак К.В. Механизмы нефропатологии токсического генеза // Патогенез. – 2019. – Т. 17. – № 2. – С. 16–29. [Sivak KV. Mechanisms of toxic nephropathy. *Pathogenesis*. 2019;17(2):16-29. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.25557/2310-0435.2019.02.16-29>.
- Magalhães P, Pontillo C, Pejčinovski M, et al. Comparison of urine and plasma peptidome indicates selectivity in renal peptide handling. *Proteomics Clin Appl*. 2018;12(5):e1700163. <https://doi.org/10.1002/prca.201700163>.
- Rus-LASA. Директива Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. – СПб., 2012. – 48 с. [Rus-LASA. Directive of the European parliament and of the Council of the European Union 2010/63/EU for the protection of animals used for scientific purposes. Saint Petersburg; 2012. 48 p. (In Russ.)]
- Kimura J, Ichii O, Otsuka S, et al. Quantitative and qualitative urinary cellular patterns correlate with progression of murine glomerulonephritis. *PLoS One*. 2011;6(1):e16472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016472>.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Antimonova OI, Lebedev DV, Zabrodskaya YA, et al. Changing times: fluorescence-lifetime analysis of amyloidogenic SF-IAPP fusion protein. *J Struct Biol*. 2019;205(1):78-83. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.11.006>.
- Стандартные технологические процедуры при проведении патологоанатомических исследований: клинические рекомендации RPS1.1. 2016 / П.Г. Мальков, Г.А. Франк, М.А. Пальцев; Российское общество патологоанатомов. – М.: Практическая медицина, 2017. – 135 с. [Standartnyye tekhnologicheskiye protsedury pri provedenii patologoanatomicheskikh issledovaniy: klinicheskiye rekomendatsii RPS1.1. 2016. P.G. Malkov, G.A. Frank, M.A. Pal'tsev. Russian Society of Pathologists. Moscow: Practical medicine; 2017. 135 p. (In Russ.)]
- Lehman-McKeeman LD, Caudill D. Biochemical basis for mouse resistance to hyaline droplet nephropathy: lack of relevance of the alpha 2u-globulin protein superfamily in this male rat-specific syndrome. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1992;112(2):214-221. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(92\)90190-4](https://doi.org/10.1016/0041-008X(92)90190-4).
- Lehman-McKeeman LD, Caudill D. d-Limonene induced hyaline droplet nephropathy in alpha 2u-globulin transgenic mice. *Fundam Appl Toxicol*. 1994;23(4):562-568. <https://doi.org/10.1006/faat.1994.1141>.
- Ланда С.Б., Аль-Шукри С.Х., Горбачев М.И., и др. Патохимические особенности олигомерных форм белка Тамма – Хорсфалла при уролитиазе // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61. – № 6. – С. 335–341. [Landa SB, Al-Shukri SH, Gorbachev MI, et al. The pathochemical characteristics of oligomeric forms of Tamm-Horsfall protein under urolithiasis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016;61(6):335-341. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-6-335-341>.
- Saunders DA, Begg EJ, Kirkpatrick CM, et al. Measurement of total phospholipids in urine of patients treated with gentamicin. *Br J Clin Pharmacol*. 1997;43(4):435-440. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1997.00568.x>.

## Сведения об авторах / Information about the authors

**Константин Владимирович Сивак** — канд. биол. наук, заведующий отделом доклинических исследований ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0003-4064-5033>. E-mail: kvsivak@gmail.com.

**Яна Александровна Забродская** — канд. физ.-мат. наук, научный сотрудник отдела молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0003-2012-9461>. E-mail: zabryaka@yandex.ru.

**Konstantin V. Sivak** — PhD in Biology, Head of the Department of Preclinical Trials of Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-4064-5033>. E-mail: kvsivak@gmail.com.

**Yana A. Zabrodskaya** — PhD in Physic, Researcher of the Department of Molecular Biology of Viruses, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Russian Ministry of Health, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-2012-9461>. E-mail: zabryaka@yandex.ru.

*Ольга Андреевна Добровольская* — научный сотрудник лаборатории генной инженерии и экспрессии рекомбинантных белков ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-0857-4733>. E-mail: [dobrovolskaya.od@gmail.com](mailto:dobrovolskaya.od@gmail.com).

*Olga A. Dobrovolskaya* — Researcher of the Laboratory of Genetic Engineering and Recombinant Protein Expression, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-0857-4733>. E-mail: [dobrovolskaya.od@gmail.com](mailto:dobrovolskaya.od@gmail.com).

✉ **Контактное лицо / Corresponding author**

*Константин Владимирович Сивак / Konstantin V. Sivak*  
E-mail: [kvsivak@gmail.com](mailto:kvsivak@gmail.com)