

Анализ РНК как перспективное направление диагностики в нефрологии

С.Л. Морозов^{1,2}, В.П. Пахомова², В.Ю. Воинова¹, В.В. Длин¹

¹ОСП «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии и детской хирургии им. акад. Ю.Е. Вельтищева» (Институт Вельтищева) ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

RNA analysis as a promising area of diagnostics in nephrology

S.L. Morozov^{1,2}, V.P. Pakhomova², V.Yu. Voinova^{1,2}, V.V. Dlin¹

¹Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics and Pediatric Surgery of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

В настоящее время традиционные диагностические инструменты не отвечают современным запросам. Методы молекулярной диагностики не только дополняют традиционные методы исследования, но и дают понимание с точки зрения молекулярной патофизиологии. Анализ матричной РНК — новая область, которая может произвести революцию в диагностике и лечении заболеваний почек. Изучение мРНК может быть применимо для диагностики и классифицирования заболеваний почек, прогнозирования прогрессирования нефропатий, контроля эффективности лечения и разработки современных подходов к терапии. Будучи новой областью, анализ мРНК сталкивается с рядом проблем и ограничений, однако с развитием технологий методика становится более доступной для применения в клинической практике.

Ключевые слова: дети, нефротический синдром, мРНК, экспрессия, биомаркеры, транскриптомика.

Для цитирования: Морозов С.Л., Пахомова В.П., Воинова В.Ю., Длин В.В. Анализ РНК как перспективное направление диагностики в нефрологии. Рос вестн перинатол и педиатр 2023; 68:(4): 24–XX. DOI: 10.21508/1027-4065-2023-68-4-24-XX

Today, medicine is at a stage when traditional diagnostic tools no longer meet current needs, which has led to the rapid development of molecular diagnostic methods that not only complement traditional research methods but also provide insight from the point of view of molecular pathophysiology. mRNA analysis is a new field that could revolutionize the diagnosis and treatment of kidney disease. The study of mRNA can be used for diagnosing and classifying kidney diseases, predicting the progression of nephropathies, monitoring the effectiveness of treatment, and developing modern approaches to therapy. As a new field, mRNA analysis faces a number of challenges and limitations, but as technology advances, the technique becomes more accessible for clinical use.

Key words: children, nephrotic syndrome, mRNA, expression, biomarkers, transcriptomics.

For citation: Morozov S.L., Pakhomova V.P., Voinova V.Yu., Dlin V.V. RNA analysis as a promising area of diagnostics in nephrology. Ros Vestn Perinatol i PEDIATR 2023; 68:(4): 24–XX (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2023-68-4-24-XX

Развитие современной медицины находится на том этапе, когда традиционные диагностические инструменты уже не отвечают ее запросам. Это

© Коллектив авторов, 2023

Адрес для корреспонденции: Морозов Сергей Леонидович — к.м.н., вед. науч. сотр. отдела наследственных и приобретенных болезней почек им. проф. М.С. Игнатовой Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. акад. Ю.Е. Вельтищева, доц. кафедры госпитальной педиатрии №2 педиатрического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, ORCID: 0000-0002-0942-0103 e-mail: mser@list.ru

Пахомова Виктория Павловна — лаборант-исследователь лаборатории клинической геномики и биоинформатики Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, ORCID: 0009-0006-1646-8427

Воинова Виктория Юрьевна — д.м.н., зам. дир. по трансляционной медицине, гл. науч. сотр. отдела клинической генетики Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000-0001-8491-0228

Длин Владимир Викторович — д.м.н., проф., рук. отдела наследственных и приобретенных болезней почек им. проф. М.С. Игнатовой, зам. дир. по научной работе в педиатрии Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000-0002-0942-0103.

125412 Москва, ул. Талдомская, д. 2

привело к стремительному развитию методов молекулярной диагностики, которые не только дополняют традиционные методы исследования, но и дают понимание механизмов заболеваний с точки зрения молекулярной патофизиологии [1]. Широкое внедрение в клиническую практику технологии секвенирования играет одну из ключевых ролей в диагностике многих заболеваний, однако накопление как клинического, так и лабораторного опыта вызывает необходимость более детального изучения патологии на постгеномном уровне, в том числе изучения динамических продуктов, таких как РНК [1, 2].

Проблемы современных диагностических подходов к заболеваниям почек

Заболевания почек — одна из наиболее распространенных и угрожающих жизни групп заболеваний. По данным Всемирной организации здравоохранения, в 2019 г. от заболеваний почек умерли 1,3 млн человек [3]. Данная статистика обусловлена множеством факторов, из которых основные — сложность патофизиологических механизмов заболеваний

почек и низкая эффективность доступных диагностических инструментов.

На протяжении многих лет используются различные подходы для поиска потенциальных «идеальных» биомаркеров, позволяющих обеспечить раннюю и точную диагностику заболеваний почек. Однако существующие классические диагностические методы, такие как анализы мочи, крови, нефробиопсия, компьютерная томография и другие, основаны на клинико-лабораторной и морфологической оценке и, несмотря на свои преимущества, характеризуются ограниченной чувствительностью и специфичностью, а также неспособностью объяснить патофизиологический механизм заболевания [4–6]. В числе главных проблем классических диагностических методов в нефрологии можно выделить то, что многие хронические болезни почек, например диабетическая нефропатия, гломерулонефрит, наследственные нефропатии, обычно демонстрируют типичный клинический симптомокомплекс лишь на поздних стадиях, когда отмечается снижение функции почек, которое, как правило, необратимо [7, 8].

В частности, при диагностике хронической болезни почек одним из референтных методов является определение уровня креатинина в сыворотке крови, однако диагностически значимое увеличение его концентрации происходит при повреждении 40–50% паренхимы почек [6, 9]. Поздняя диагностика хронической болезни почек особенно характерна для пациентов с атипичной или стертой клинической картиной заболевания. Один из ярких примеров — частая поздняя диагностика диабетической нефропатии. Известно, что на ранних стадиях диабетическая нефропатия протекает бессимптомно и единственным маркером ее развития служит появление микроальбуминурии (>30 мг/сут). Однако замечено, что примерно у 30% пациентов с диабетической нефропатией этот симптом регрессирует и использование указанной методики в качестве основного скринингового теста затрудняет своевременную постановку диагноза у пациентов этой группы. Это увеличивает риск развития ранних осложнений, в том числе прогрессирования диабетической нефропатии вплоть до развития хронической почечной недостаточности [9, 10].

Наиболее существенный недостаток морфологических и клинических методов диагностики в том, что они не всегда позволяют точно определить причину заболевания и степень повреждения почек, а это может затруднить выбор наиболее эффективного лечения. В частности, распространенные методы клинико-лабораторной диагностики, такие как анализ крови и мочи, предоставляют лишь косвенные данные об изменениях в почках и не всегда могут быть информативны для понимания конкретных причин отклонений в показателях. Кроме того, получаемые результаты могут зависеть от влияния

других факторов. Например, уровень креатинина в сыворотке крови зависит от большого количества условий, среди которых возраст, раса, диета, сопутствующие заболевания и другие факторы, которые могут и усложнить интерпретацию данных [11].

Наиболее информативным методом диагностики заболеваний почек признано морфологическое исследование биоптата [12, 13]. При ряде нефрологических заболеваний нефробиопсия является «золотым стандартом», однако, несмотря на преимущества, существует масса ограничений для ее использования. Следует помнить, что биопсия относится к инвазивным методикам, которые чреватые серьезными осложнениями для пациента. Так, в метаанализе С.Д. Varnell и соавт. (2019) [14], проведенном на основе 23 исследований, выполнена статистическая обработка данных об осложнениях 5504 чрескожных биопсий почки под контролем ультразвука. В результате установлено, что в ходе биопсии у 11–18% больных развилась гематома, 0,9% больных нуждались в переливании крови и в 0,7% случаев требовались дополнительные медицинские вмешательства, в том числе оперативные [14]. Кроме того, сама методика имеет высокую стоимость и большой список противопоказаний, в связи с чем может быть доступной не для всех пациентов.

По этим причинам возникает необходимость разработки и интеграции в клиническую практику современных диагностических методов для выявления ранних стадий нефропатий, которые будут высокоинформативны и вместе с тем безопасны для пациентов. Одно из перспективных направлений, потенциально отвечающих данным критериям, — молекулярная диагностика, методы которой могут помочь не только определить конкретную причину заболевания, но также и прогнозировать его возможный исход и предложить эффективное лечение. Особый интерес в данной сфере представляют такие направления, как транскриптомика, протеомика и метаболомика, так как они позволяют оценить текущее состояние организма и могут зафиксировать молекулярные изменения в тканях почек на ранних стадиях заболевания.

Возможности молекулярной диагностики

Достижения в области молекулярной биологии за последние годы способствовали смещению тенденций современной медицины в сторону молекулярной диагностики и внедрению ее методик в повседневную клиническую практику. С помощью молекулярных методов появилась возможность ставить более точные диагнозы, прогнозировать течение заболевания, а также подбирать индивидуальные стратегии лечения для каждого пациента.

Методы молекулярной диагностики характеризуются универсальностью, высокой чувствительностью и специфичностью, высокой скоростью

получения результатов и возможностью автоматизации, что также снижает вероятность ошибок. Молекулярная диагностика также играет важную роль в понимании патогенеза заболеваний и способствует переходу к персонализированной медицине [2, 5, 7, 8]. Системное исследование генотипа и фенотипа может дать более полное представление о механизмах развития патологий, например изучение генетических нарушений клеточных органелл, таких как реснички, может дать представление о патогенезе цилиопатий [8, 15].

Молекулярная диагностика представляет собой группу методов, основанных на анализе молекулярных маркеров, в качестве которых могут выступать молекулы ДНК, РНК и белков. Эти методы позволяют обнаруживать генетические изменения, связанные с различными заболеваниями, включая онкологические, инфекционные и генетические нарушения. В отличие от морфоклинических исследований, которые основаны на визуальном анализе тканей и клеток и на анализе физиологических показателей, молекулярная диагностика позволяет получать более точную информацию о состоянии организма путем выявления конкретных генетических маркеров, которые могут быть связаны с определенными заболеваниями, а также о наличии определенных генетических предрасположенностей.

Молекулярная диагностика включает группу наук, также известных как «омики»: геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика и другие. Особый интерес представляет транскриптомика — область молекулярной биологии, которая исследует РНК, производимые клеткой в определенный момент времени, и таким образом позволяет сформировать профили экспрессии генов, т.е. определить, какие гены активны в данной клетке или ткани. Особенность экспрессии генов конкретного пациента может влиять на клиническое течение болезни, следовательно, транскриптомика открывает возможность применять индивидуальные подходы. Под область исследования транскриптомики включены все РНК-транскрипты организма: как кодирующие, так и не кодирующие. В нашей работе мы более подробно рассмотрим роль матричной РНК (мРНК) — молекулы, непосредственно демонстрирующей, какие гены экспрессируются в данный момент, так как она демонстрирует многообещающие результаты в выяснении молекулярных механизмов, лежащих в основе заболеваний почек [2].

Матричная РНК — это кодирующая молекула-посредник, которая отвечает за перевод генетической информации из ДНК в белки, и анализ мРНК может дать информацию не только о наличии предрасположенностей, но и о том, какие гены активны или неактивны при определенном заболевании или состоянии [16–18]. Используя анализ мРНК, возможно идентифицировать изменения в экспрессии, которые

могут быть связаны с повреждениями почек до того, как они станут заметными при использовании других тестов, что делает мРНК перспективным биомаркером [2]. Дополнительное преимущество заключается в возможности использования в качестве анализируемого материала не только непосредственно ткани почек, но и непочечные материалы, такие как периферическая кровь, моча. Это позволяет повысить точность диагностики без применения инвазивных методик. Например, образцы мРНК можно получить из клеток, содержащихся в моче, при этом, в отличие от исследования белков мочи, такие факторы, как протеинурия и канальцевая реабсорбция, оказывают сравнительно малое влияние на содержание мРНК [19, 20].

Данный метод позволяет обнаружить мРНК, кодирующую такие белки, как перфорин, гранзим В, интегрин (CD103), интерферон-С, TIM-3, гранулизин и другие, которые могут служить диагностическими маркерами острого отторжения почечного аллотрансплантата. Некоторые из маркеров, такие как гранулизин, позволяют еще на ранних стадиях диагностировать отторжение почечного аллотрансплантата, до повышения уровня креатинина в сыворотке крови, а такие маркеры, как CXCL-10 и CXCL-9, могут прогнозировать эпизод отторжения примерно за неделю до его начала [19, 21, 22].

Методы анализа мРНК также могут быть использованы для выявления предрасположенности к определенным нефропатиям и прогнозирования течения заболевания, что позволяет своевременно принимать профилактические меры. В частности, такие методы могут быть применены для диагностики и мониторинга состояния почечных трансплантатов. В своем исследовании W. Zhang и соавт. (2019) [23], наблюдая за пациентами с субклиническим острым клеточным отторжением почечного трансплантата через 3 мес после трансплантации, определили набор из 17 генов в клетках периферической крови, экспрессия которых коррелировала с субклиническим отторжением трансплантата. На основе этого набора генов была разработана диагностическая панель для анализа экспрессии мРНК заинтересованных генов, с помощью которой возможно определить иммунопатологический процесс в трансплантате задолго до того, как отреагирует креатинин сыворотки крови. Представленная диагностическая система на основе анализа мРНК продемонстрировала высокую чувствительность и воспроизводимость, что делает его высокоточным методом для мониторинга состояния трансплантата и выявления пациентов, склонных к острому отторжению и возможной потере трансплантата в будущем. Более того, этот метод позволяет наблюдать за трансплантатом без необходимости биопсии и до того, как появятся функциональные признаки повреждения [23].

Информация об экспрессии генов также полезна для понимания патогенеза заболевания и дальнейшей

разработки стратегии лечения. Анализ мРНК имеет большой потенциал в нефрологии, так как позволяет идентифицировать генные профили и особенности экспрессии, которые могут помочь в диагностике и лечении различных заболеваний почек.

Одним из крупнейших исследований в сфере молекулярной нефропатологии была работа К.И. Wogoniecka и соавт. (2011) [24], посвященная анализу изменений транскриптов при диабетической нефропатии. В ходе изучения экспрессии генов в изолированных клубочках было замечено, что при диабетической нефропатии происходит выраженное (в 4–9 раз) снижение экспрессии генов, специфичных для подоцитов, таких как *NPHS1*, *NPHS2*, *SYNPO*, *WT1*, *PLCE1*, *PDXL*, *PLA2R1* и *VEGF*. Эти данные свидетельствуют о критической роли потери подоцитов в развитии диабетической нефропатии [24].

В ряде других транскриптомных исследований, также посвященных диабетической нефропатии, замечено, что при этом заболевании повышается экспрессия цитокинов, в частности *CCL5* (*RANTES*), *IL-6*, *TNF-α* и *CCL2* (*MCP-1*). Предполагается, что указанное явление может быть связано с чрезмерной активацией транскрипционного фактора *NF-κB* (ядерный фактор «каппа-би»; nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, *NF-κB*) и сигнального пути *JAK/STAT* (янус-киназа — *JAK*/преобразователь сигнала и активатор транскрипционных белков — *STAT*), и может усугубляться эпигенетическими факторами. Дополнительные исследования обнаружили, что ингибирование *CCL2* (*C-C motif ligand 2*) защищает от развития диабетической нефропатии в моделях животных с сахарным диабетом [10].

Транскриптомика также позволила продвинуться в изучении патогенеза аутоиммунных патологий. Известно, что нарушение соотношения субпопуляций Т-хелперов, в частности *Th1/Th2*, может приводить к аутоиммунным повреждениям почек. Исследования экспрессии мРНК *TIM-3* — негативного регулятора *Th1* — показали, что снижение экспрессии белка ведет к нарушению этого баланса, и это может свидетельствовать о потенциальной роли *TIM-3* не только как биомаркера, но и как терапевтической мишени при аутоиммунных нефропатиях, например мембранозной нефропатии [25].

При оценке особенностей экспрессии генов иммунной системы при стероид-резистентном нефротическом синдроме была показана достоверно низкая экспрессия мРНК генов *KIR Inhibiting Subgroup 1*; *KIR Inhibiting Subgroup 2* и *KIR3*. Семейство генов *KIR* представляет трансмембранные гликопротеиды, локализованные на плазматической мембране, участвующие в образовании *NK*-клеток и Т-лимфоцитов, и взаимодействует с молекулами лейкоцитарного антигена человека (*HLA*) I класса, который экспрессируется на ядерных клетках всех типов. Снижение экспрессии генов семейства транс-

мембранных гликопротеинов, которые взаимодействуют с молекулами первого класса лейкоцитарного антигена человека (*HLA* I), может лежать в основе патогенеза стероид-резистентного нефротического синдрома и определять тяжесть его течения [26].

Анализ мРНК важен не только для постановки диагноза, но и для определения конкретного подтипа и особенностей патогенеза заболевания. В упомянутой ранее работе К.И. Wogoniecka и соавт. (2011) [24] отмечена повышенная экспрессия транскриптов генов, связанных с воспалением и фиброзом, таких как *IGH* (в 14 раз), *C3* (в 6 раз), *COL1A2* (в 6 раз), *CXCL6* (в 5 раз) и *COL6A3* (в 4,6 раза). Это особенно интересно в контексте того, что диабетическая нефропатия считается невоспалительным заболеванием. Хотя наличие воспалительных маркеров, например *C3* компонента комплемента, в клубочках было описано и ранее, тогда считалось, что белок пассивно захватывается пораженными клубочками. Однако данные по экспрессии компонентов комплемента в клубочках показывают, что *C3* синтезируется локально. Следует отметить, что данное явление характерно только для 50–60% случаев, тем не менее оно коррелирует со степенью выраженности гломерулосклероза и вероятностью прогрессирования диабетической нефропатии, что ставит необходимость выделения новой подгруппы пациентов с данными патогенетическими особенностями [24].

В последнее время в клиническую медицину стали активно внедряться принципы фармакогеномики, благодаря которым посредством анализа экспрессии мРНК возможно предположить, какие результаты и эффекты принесет тот или иной вариант терапии для конкретного пациента, что может использоваться для определения наилучшего плана лечения. Такой подход может повысить эффективность лечения при минимизации нежелательных явлений.

Одна из актуальных проблем в медицине и, в частности, в нефрологии — резистентность к стероидным препаратам. D.M. Youssef и соавт. (2011) [27] провели исследование уровней экспрессии гена *MDR1* и растворимого рецептора интерлейкина-2 человека (*sIL2R*) в лимфоцитах детей с нефротическим синдромом, которые получали терапию кортикостероидами. У пациентов со стероидрезистентным синдромом было выявлено достоверное повышение уровня *sIL2R* и экспрессии гена *MDR1* по сравнению со стероидчувствительными пациентами, что подтверждает роль *MDR1* в патогенезе стероидрезистентности и свидетельствует о его потенциальной роли в качестве биомаркера нечувствительности к данной терапии [27].

Те же данные получены в исследовании С.Л. Морозова и соавт. (2021) [28], в котором продемонстрировано, что уровень экспрессии гена *ABCB1* у пациентов со стероидрезистентным вариантом нефротического синдрома был достоверно выше,

чем у пациентов, которые были чувствительны к стероидной терапии. Вместе с тем выявлены достоверные различия экспрессии *ABCVI* между стероидзависимыми и стероидчувствительными вариантами нефротического синдрома. В клинической практике больные со стероидзависимым нефротическим синдромом часто дают рецидивы заболевания на фоне отмены преднизолона, что, вероятнее всего, объясняется быстрой элиминацией преднизолона и в дальнейшем требует пересмотра схемы терапии.

Еще одно исследование на чувствительность к глюкокортикоидам проведено R. Donn и соавт. [29]. Глюкокортикоиды — эффективные иммуномодуляторы, однако ответ на данную терапию, в частности частота и характер побочных эффектов, зависит от индивидуальных особенностей пациента. Некоторые побочные эффекты, например остеопороз, могут привести к клинически значимым осложнениям. Чтобы определить генетические основы чувствительности, 100 здоровых добровольцев на основании дексаметазоновой пробы были распределены на наиболее чувствительных к глюкокортикоидам и наиболее устойчивых к ним. После анализа экспрессии было идентифицировано 98 генов, потенциально связанных с регуляцией глюкокортикоидов, среди которых особый интерес вызвал *BMPRII*. Продукт гена *BMPRII* служит модулятором передачи сигналов глюкокортикоидов, и при дополнительном изучении показана возможность использования транскриптов данного гена в качестве прогнозирования стероидчувствительности [29].

В целом за последние несколько лет транскриптомика проявила себя важным инструментом в клинической практике, и анализ мРНК постепенно выходит на передний рубеж научных и медицинских исследований, в том числе в области диагностики.

Перспективы и развитие метода анализа мРНК

Развитие методов анализа мРНК открывает новые возможности персонализированного подхода к изучению патологии на различных уровнях взаимодействия. Перспективы и возможности развития методов транскриптомики для нефропатологии весьма значительны. Как показано ранее, использование анализа мРНК в нефрологии может привести к разработке новых методов диагностики и лечения заболеваний почек, а также помочь в более глубоком понимании молекулярных механизмов, лежащих в их основе. Более широкое использование транскриптомики в клинической практике также может привести к улучшению диагностики и лечения заболеваний почек, что может значительно улучшить качество жизни пациентов и снизить затраты на здравоохранение.

Однако следует отметить, что эти методы все еще находятся в стадии разработки и усовершенствования и имеют ограничения, поэтому, несмотря на все преимущества, в настоящее время анализ мРНК

не может заменить полностью классические исследования. Комбинирование различных методов позволяет провести более точную диагностику и определить оптимальное лечение для пациента.

Одно из основных ограничений методов молекулярной диагностики в настоящее время — их высокая стоимость и сложность. Многие методы обуславливают необходимость специализированного оборудования и работы высококвалифицированных специалистов, что может быть недоступно для некоторых лабораторий и клиник. Некоторые методы могут давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты. Например, такие методы, как секвенирование РНК, требуют обратной транскрипции РНК до кДНК, в ходе которой могут возникать ошибки в последовательности нуклеотидов, что может привести к неправильной интерпретации данных.

Еще одно ограничение состоит в необходимости использования качественных образцов биоматериала. При анализе мРНК необходимо использовать высококачественную РНК, что может представлять сложности при работе с тканями после долгого хранения или воздействия сторонних факторов, таких как температура. Одна из основных проблем выделения РНК заключается в том, что ее молекулы очень чувствительны к деградации рибонуклеазами. Неправильное хранение и оттаивание замороженного материала приводят к разрушению РНК [30].

Более того, не во всех исследованиях можно ориентироваться исключительно на транскриптомику: существуют данные, что только 1/3 белков с измененной экспрессией имеет соответствующие изменения на уровне мРНК [11]. Дополнительное применение методов протеомики и использование белковых биомаркеров позволит более точно отражать реальные биологические процессы, поэтому для достижения объективного результата рекомендуется использовать комбинации различных методов.

Тем не менее в будущем методы транскриптомики могут стать еще более точными и эффективными. С развитием технологий анализа экспрессии генов, а также анализа больших данных (big-data) станет возможным проводить более детальное исследование экспрессии в различных биоматериалах, а возможность автоматизации процессов приведет к снижению вероятности ошибок и повышению скорости исследований.

Потенциальный интерес, в частности, представляют методы машинного обучения и искусственного интеллекта, которые можно будет применить для анализа данных транскриптомики. Использование подобных технологий может значительно ускорить анализ данных и снизить стоимость методик. В последние годы интерес к технологиям глубокого обучения (deep learning) существенно вырос, и уже сейчас разрабатываются и интегрируются инструменты, способные обрабатывать большие данные и определять сложные

взаимосвязи. Так, в 2021 г. X. Shao и соавт. [31] представили высокопроизводительный предварительно обученный инструмент scDeepSort для определения клеточного типа при транскриптомике отдельных клеток методом scRNA-seq.

Помимо одиночных изменений мРНК, перспективным подходом представляется идентификация полных транскрипционных сетей, включающих различные транскрипционные факторы, промоторы, микроРНК и другие регуляторные элементы. Изучение коэкспрессии генов может помочь понять, какие гены работают вместе в определенных процессах и функциях клеток. Это позволяет выявлять новые биологические пути и механизмы, которые ранее не были известны, а также идентифицировать потенциальные терапевтические мишени. Совместно регулируемые гены могут быть связаны с несколькими клеточными путями, и анализ транскрипционных сетей может помочь определить их общий функциональный контекст. Такой подход представляется оправданным, поскольку дифференциальная экспрессия генов проявляет себя в первую очередь на транскриптомном уровне [16]. Для построения транскрипционных сетей также важно более детальное изучение роли микроРНК, так как одна микроРНК связывается с несколькими мРНК и соответственно одна мРНК может регулироваться несколькими микроРНК, что формирует сложную регуляторную сеть [31]. Эффекты изменения профиля экспрессии могут быть связаны как с отдельной микроРНК, так и со всей совокупностью микроРНК, влияющих на конкретную мРНК, и понимание всей системы взаимодействий в транскриптомике позволит более точно интерпретировать результаты молекулярных анализов [32].

В настоящее время существует большое количество инструментов и методов для изучения транскриптомике и оценки экспрессии генов, к которым относят микрочипы, секвенирование РНК (RNA-seq), количественную полимеразную цепную реакцию (a real-time polymerase chain reaction qPCR) и др. Эти инструменты и методики постоянно улучшаются и развиваются, что также способствует прогрессу в сфере исследования мРНК и интеграции данного метода в клиническую практику.

В последние годы перспективным инструментом для исследования экспрессии показала себя технология nCounter от компании Nanostring technologies, которая также была представлена на Банфской конференции по патологии аллотрансплантатов [33]. Технология использует надежный мультиплексный количественный анализ транскриптов практически любых типов образцов: кровь, лизаты, замороженные ткани, FFPE и т.д. Система построена на модификации технологии ДНК-микрочипов с использованием метода мечения мишеней флуоресцентными метками с уникальными цветовыми штрих-кодами и их

последующей детекцией. Метки имеют особое строение, состоящее из молекулярных зондов двух типов: таргетный (захватывающий) и репортерный (флуоресцирующий), причем основное преимущество этой технологии заключается в возможности использовать различные типы молекулярных мишеней: как ДНК, так и РНК и белков [2]. Одно из главных преимуществ этого метода по сравнению с существующими платформами экспрессии генов состоит в отсутствии этапов амплификации и обратной транскрипции, которые вносят изменчивость и повышают частоту ошибок. Кроме того, метод характеризуется высокой производительностью и чувствительностью, объединяя преимущества qPCR и NGS (next generation sequencing) [2, 33]. Наконец, Nanostring — относительно простой в использовании и высокоавтоматизированный метод, который не требует особой подготовки и занимает всего несколько минут рабочего времени. Это делает его доступным для широкого круга исследователей и позволяет быстро получать результаты исследований.

В нефрологии технология Nanostring используется для транскриптомных исследований почечных тканей и клеток, периферической крови и других материалов. Это позволяет выявлять изменения в экспрессии генов при различных заболеваниях почек, таких как гломерулонефрит, диабетическая нефропатия и др. На Банфской конференции была представлена расширенная нефрологическая панель В-НОТ, которая включает 770 генов, связанных с отторжением, толерантностью, вирусными инфекциями, иммунными реакциями и др. [33]. Эта панель протестирована в исследовании и подтверждена ее потенциальная возможность не только определить отторжение трансплантата, но и дифференцировать антителоопосредованное отторжение от Т-клеточного. Таким образом, технология Nanostring — эффективный инструмент для исследования механизмов развития заболеваний почек и может помочь в разработке новых методов диагностики и лечения.

Заключение

Активное развитие методов молекулярной диагностики заболеваний почек открывает большой раздел медицины, который можно назвать молекулярной нефропатологией. Дальнейшее изучение заболеваний почек с позиции молекулярной биологии позволит понять патогенез многих заболеваний и решить ряд проблем с позиций персонализированной терапии, которая учитывает индивидуальные особенности пациента.

Анализ мРНК — это новая область, которая может произвести революцию в диагностике и лечении заболеваний почек. Изучение мРНК может быть применимо для диагностики и классифицирования заболеваний почек, прогнозирования прогрессиру-

вания нефропатий, контроля эффективности лечения и разработки современных подходов к терапии. Будучи новой областью, анализ мРНК сталкивается с рядом проблем и ограничений, однако с развитием технологий методика становится более доступной для применения в клинической практике. В частности, новая технология Nanostring совместила в себе такие преимущества, как скорость, точность, высокую производительность и автоматизацию, показав себя как крайне эффективный инструмент для анализа экспрессии.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Морозов С.Л., Длин В.В., Сухоруков В.С., Воронкова А.С. Молекулярная нефропатология: новые возможности диагностики заболеваний почек. Российский вестник перинатологии и педиатрии 2017; 62(3): 32–36. [Morozov S.L., Dlin V.V., Sukhorukov V.S., Voronkova A.S. Molecular nephropathology: new possibilities for diagnosing kidney diseases. Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii 2017; 62(3): 32–36. (in Russ.)] DOI: 10.21508/1027–4065–2017–62–3–32–36
2. Морозов С.Л., Воронкова А.С., Длин В.В., Туркина Т.И., Сухоруков В.С. Анализ экспрессии генов по технологии nCounter Nanostring в медицинских исследованиях: опыт использования у детей с нефротическим синдромом. Российский вестник перинатологии и педиатрии 2019; 64(1): 110–115. [Morozov S.L., Voronkova A.S., Dlin V.V., Turkina T.I., Sukhorukov V.S. Analysis of gene expression using nCounter Nanostring technology in medical research: experience of use in children with nephrotic syndrome. Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii 2019; 64(1): 110–115. (in Russ.)] DOI: 10.21508/1027–4065–2019–64–1–110–115
3. Neuen B.L., Bello A.K., Levin A., Lunney M., Osman M.A., Ye F. et al. National health policies and strategies for addressing chronic kidney disease: Data from the International Society of Nephrology Global Kidney Health Atlas. PLOS Glob Public Health 2023; 3(2): e0001467. DOI: 10.1371/journal.pgph.0001467
4. Морозов С.Л., Аксенова М.Е. Первичный нефротический синдром у детей. Перспективы персонализированной терапии. Практическая Медицина 2018; (8): 39–42. [Morozov S.L., Aksenova M.E. Primary nephrotic syndrome in children. Prospects for personalized therapy. Prakticheskaya Meditsina 2018; 8: 39–42. (in Russ.)]
5. Игнатова М.С., Длин В.В. Нефротический синдром: прошлое, настоящее и будущее. Российский вестник перинатологии и педиатрии 2017; 62(6): 29–44. [Ignatova M.S., Dlin V.V. Nephrotic syndrome: past, present and future. Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii 2017; 62(6): 29–44. (in Russ.)] DOI: 10.21508/1027–4065–2017–62–6–29–44
6. Liu K-Z., Tian G., Ko A.C.-T., Geissler M., Brassard D., Veres T. Detection of renal biomarkers in chronic kidney disease using microfluidics: progress, challenges and opportunities. Biomed Microdevices 2020; 22(2): 29. DOI: 10.1007/s10544–020–00484–6
7. Длин В.В., Морозов С.Л. Персонализированная терапия в детской нефрологии: проблемы и перспективы. Российский вестник перинатологии и педиатрии 2021; 66(2): 6–12. [Dlin V.V., Morozov S.L. Personalized therapy in pediatric nephrology: problems and prospects. Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii. 2021; 66(2): 6–12. (in Russ.)] DOI: 10.21508/1027–4065–2021–66–2–6–12
8. Игнатова М.С., Морозов С.Л., Крыганова Т.А., Шенцева Д.В., Назарова Н.Ф., Конькова Н.Е. et al. Современные представления о врожденных аномалиях органов мочевой системы (синдром САКУТ) у детей. Клиническая нефрология 2013; 2: 58–64. [Ignatova M.S., Morozov S.L., Kryganova T.A., Shentseva D.V., Nazarova N.F., Konkova N.E. et al. Modern ideas about congenital anomalies of the urinary system (CAKUT syndrome) in children. Klinicheskaya nefrologiya 2013; 2: 58–64. (in Russ.)]
9. Mizdrak M., Kumrić M., Kurir T.T., Božić J. Emerging biomarkers for early detection of chronic kidney disease. JPM 2022; 12(4): 548. DOI: 10.3390/jpm12040548
10. Reidy K., Kang H.M., Hostetter T., Susztak K. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease. J Clin Invest 2014; 124(6): 2333–2340. DOI: 10.1172/JCI72271.
11. Yan Z., Wang G., Shi X. Advances in the progression and prognosis Biomarkers of chronic kidney disease. Front Pharmacol 2021; 12: 785375. DOI: 10.3389/fphar.2021.785375
12. Длин В.В., Морозов С.Л. Нефротический синдром: возможна ли персонализированная терапия? Обзор. Педиатрия. Восточная Европа 2023; 11(1): 65–76. [Dlin V.V., Morozov S.L. Nephrotic syndrome: Is personalized therapy possible? Review. Pediatriya. Vostochnaya Evropa 2023; 11(1): 65–76. (in Russ.)] DOI: 10.34883/PI.2023.11.1.007
13. Морозов С.Л., Коваль Н.Ю., Столяревич Е.С., Пирузиева О.Р., Лепяева Т.В., Никишина Т.А. и др. Волчаночный нефрит как актуальная проблема педиатрической нефрологии. Клинический пример люпус нефрита I класса у ребенка с нефротическим синдромом. Практическая Медицина 2022; 20(2): 13–19. [Morozov S.L., Koval N.Yu., Stolyarevich E.S., Piruzieva O.R., Lepaeva T.V., Nikishina T.A. et al. Lupus nephritis as an actual problem of pediatric nephrology. A clinical example of class I lupus nephritis in a child with nephrotic syndrome. Prakticheskaya meditsina 2022; 20(2): 13–19. (in Russ.)]
14. Varnell C.D., Stone H.K., Welge J.A. Bleeding complications after pediatric kidney biopsy: A Systematic Review and Meta-Analysis. CJASN. 2019; 14(1): 57–65. DOI: 10.2215/CJN.05890518
15. Floege J., Mak R.H., Molitoris B.A., Remuzzi G., Ronco P. Nephrology research — the past, present and future. Nat Rev Nephrol 2015; 11(11): 677–687. DOI: 10.1038/nrneph.2015.152
16. Molecular biology of the cell. 5th ed. Editor: B. Alberts New York: Garland Science; 2008: 1392.
17. Crick F.H. The genetic code—yesterday, today, and tomorrow. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1966; 31: 1–9.
18. Moore M.J., Proudfoot N.J. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. Cell 2009; 136(4): 688–700. DOI: 10.1016/j.cell.2009.02.001
19. Van De Vrie M., Deegens J.K., Eikmans M., Van Der Vlag J., Hilbrands L.B. Urinary MicroRNA as Biomarker in Renal Transplantation. Am J Transplant 2017; 17(5): 1160–1166. DOI: 10.1111/ajt.14082

20. Li B., Hartono C., Ding R., Sharma V.K., Ramaswamy R., Qian B. et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 2001; 344(13): 947–954. DOI: 10.1056/NEJM200103293441301
21. Mas V.R., Dumur C.I., Scian M.J., Gehrau R.C., Maluf D.G. MicroRNAs as biomarkers in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013; 13(1): 11–19. DOI: 10.1111/j.1600–6143.2012.04313.x
22. ilflingseder J., Reindl-Schwaighofer R., Sunzenauer J., Kainz A., Heinzl A., Mayer B. et al. MicroRNAs in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2015; 30(6): 910–917. DOI: 10.1093/ndt/gfu280
23. Zhang W., Yi Z., Keung K.L., Shang H., Wei C., Cravedi P. et al. A peripheral blood gene expression signature to diagnose subclinical acute rejection. *JASN [Internet]* 2019; 30(8): 1481–1494. DOI: 10.1681/ASN.2018111098
24. Woroniecka K.I., Park A.S.D., Mohtat D., Thomas D.B., Pullman J.M., Susztak K. Transcriptome analysis of human diabetic kidney disease. *Diabetes* 2011; 60(9): 2354–2369. DOI: 10.2337/db10–1181
25. Kalantari S., Nafar M. A comprehensive narrative review of diagnostic biomarkers in human primary membranous nephropathy. *Biomark Med* 2017; 11(9): 781–797. DOI: 10.2217/bmm-2017–0081
26. Морозов С.Л. Особенности экспрессии генов иммунной системы при стероидрезистентном нефротическом синдроме. *Российский вестник перинатологии и педиатрии* 2018; 63(4): 221–222. [Morozov S.L. Peculiarities of immune system gene expression in steroid-resistant nephrotic syndrome. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii* 2018; 63(4): 221–222. (in Russ.)] DOI: 10.21508/1027–4065-congress-2018
27. Youssef D.M., Elbehidy R.M., Abdelhalim H.S., Amr G.E. Soluble interleukine-2 receptor and MDR1 gene expression levels as inflammatory biomarkers for prediction of steroid response in children with nephrotic syndrome. *Iran J Kidney Dis* 2011; 5(3): 154–161.
28. Морозов С.Л., Воронкова А.С., Длин В.В. Значение экспрессии гена *ABCB1* у детей с идиопатическим нефротическим синдромом. *Нефрология* 2021; 25(1): 83–89. [Morozov S.L., Voronkova A.S., Dlin V.V. Significance of *ABCB1* gene expression in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Nefrologiya* 2021; 25(1): 83–89. (in Russ.)] DOI: 10.36485/1561–6274–2021–25–1–83–89
29. Donn R., Berry A., Stevens A., Farrow S., Betts J., Stevens R. et al. Use of gene expression profiling to identify a novel glucocorticoid sensitivity determining gene, *BMPRII*. *FASEB J* 2007; 21(2): 402–414. DOI: 10.1096/fj.06–7236com
30. Eikmans M., Baelde H.J., De Heer E., Buijn J.A. Messenger RNA assessment in clinical nephrology: perspectives and progress of methodology. *Nephrol Dialys Transplant* 2005; 20(12): 2598–2601. DOI: 10.1093/ndt/gfi176
31. Shao O., Yang H., Zhuang X., Liao J., Yang P., Cheng J. et al. scDeepSort: a pre-trained cell-type annotation method for single-cell transcriptomics using deep learning with a weighted graph neural network. *Nucleic Acids Res* 2021; 49(21): e122–e122. DOI: 10.1093/nar/gkab775
32. Камышова Е.С., Бобкова И.Н., Кутырина И.М. Современные представления о роли микроРНК при диабетической нефропатии: потенциальные биомаркеры и мишени таргетной терапии. *Сахарный диабет* 2017; 20(1): 42–50. [Kamyshova E.S., Bobkova I.N., Kutyrina I.M. Modern ideas about the role of microRNAs in diabetic nephropathy: potential biomarkers and targets for targeted therapy. *Saharnyi diabet* 2017; 20(1): 42–50. (in Russ.)] DOI: 10.14341/DM8237
33. Mengel M., Loupy A., Haas M., Roufosse C., Naesens M., Aklonis E. et al. Banff 2019 Meeting Report: Molecular diagnostics in solid organ transplantation—Consensus for the Banff Human Organ Transplant (B-HOT) gene panel and open source multicenter validation. *Am J Transplant* 2020; 20(9): 2305–2317. DOI: 10.1111/ajt.16059

Поступила: 17.05.23

Received on: 2023.05.17

Работа выполнена в рамках финансирования госзадания «Клинические и молекулярно-генетический критерии прогнозирования эффективности стероидной и иммуносупрессивной терапии первичного нефротического синдрома у детей» № 200080056

The work was supported by the State Assignment «Clinical and molecular genetic criteria for predicting the effectiveness of steroid and immunosuppressive therapy for primary nephrotic syndrome in children» No. 200080056

Конфликт интересов:

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

Conflict of interest:

The authors of this article confirmed the lack of conflict of interest, which should be reported.