

УДК 577.113;577.123

## Внеклеточные нуклеиновые кислоты мочи: источники, состав, использование в диагностике

О. Е. Брызгунова<sup>1\*</sup>, П. П. Лактионов<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8<sup>2</sup>Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

\*E-mail: olga.bryzgunova@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 29.10.2014

После доработки 19.05.2015

**РЕФЕРАТ** Внеклеточные нуклеиновые кислоты (внНК) могут появляться в моче в результате некроза и апоптоза клеток, а также активной секреции нуклеиновых кислот здоровыми и опухолевыми клетками мочеполового тракта, транспорта циркулирующих нуклеиновых кислот (цирНК) крови в первичную мочу. ДНК и РНК мочи фрагментированы, однако они могут использоваться для выявления маркерных последовательностей. МикроРНК также представляют интерес в качестве диагностического материала. Стабильность внНК определяется их структурой, упаковкой в надмолекулярные комплексы и активностью нуклеаз в моче. В обзоре описаны возможные источники, особенности строения внНК мочи, диагностическое использование внНК и факторы, влияющие на их стабильность.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** активная секреция, апоптоз, внеклеточная ДНК и РНК мочи, неинвазивная диагностика, некроз, нуклеазы мочи.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** внДНК – внеклеточные ДНК; внНК – внеклеточные нуклеиновые кислоты; внРНК – внеклеточные РНК; НК – нуклеиновые кислоты; цирНК – циркулирующие нуклеиновые кислоты.

### ИСТОЧНИКИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МОЧИ (РИСУНОК)

Внеклеточные нуклеиновые кислоты (НК) могут появляться в моче в результате транспорта внНК крови через почки и непосредственно из клеток, контактирующих с этой биологической жидкостью. Механизмы генерации и общие свойства внеклеточных или циркулирующих НК крови суммированы в обзорах [1, 2]. Считается, что основной источник внНК – апоптоз клеток. В крови НК циркулируют в составе комплексов с биополимерами и могут быть упакованы в мембранные структуры [1, 3]. Циркулирующая ДНК сильно фрагментирована, а размер фрагментов пропорционален нуклеосоме [1]. В крови обнаруживаются как мРНК, рибосомная РНК, так и некодирующие РНК, микроРНК, которые могут циркулировать как в составе нуклеопротеиновых комплексов, так и в составе покрытых мембранами микрочастиц, в том числе экзосом [4–6]. Транспорт нуклеиновых кислот из крови в первичную мочу подразумевает транспорт компонентов из приносящей артерии в полость почечного тельца.

Отвечающая за этот процесс клубочковая фильтрация веществ из плазмы крови ограничена проницаемостью базальной мембраны и щелевых мембран между «ножками» подоцитов. Так, в просвет нефрона могут проходить комплексы диаметром не более 6.4 нм [7] и молекулярной массой не более 70 кДа [8], что соответствует ДНК размером около 100 п.н. Размер пор гломерулярного барьера равен примерно 30 Å, хотя обнаружены и шунтоподобные поры радиусом 110–115 Å, однако их количество очень мало [9]. Важную роль в прохождении веществ через юкстагломерулярный аппарат играют отрицательно заряженные молекулы: полианионы, входящие в состав базальной мембраны, и сиалогликопротеины в выстилке, лежащей на поверхности подоцитов и между их «ножками» [7]. Как известно, ДНК [10–12] и РНК [13–15] в крови находятся преимущественно в составе надмолекулярных комплексов, таких, как нуклеосомы [1], комплексы РНК с липопротеинами крови [16, 17], или более крупных, защищенных мембраной микрочастиц и экзосом [4] или апоптотических телец. Однако размер мононуклеосомы превышает просвет



Источники внеклеточных нуклеиновых кислот крови и мочи

даже самых больших пор почечного барьера и, поэтому, в своей классической конфигурации мононуклеосомы пройти сквозь барьер не могут.

На транспорт молекул нуклеиновых кислот из крови может влиять и общее состояние здоровья пациента. Еще в 1967 году обнаружили увеличение количества ДНК в моче больных острым панкреатитом [18], а в 2012 году показали, что моча курящих людей содержит больше ДНК, чем моча некурящих (9.46 и 9.04 нг/мкл – у женщин соответственно; 4.96 и 2.93 нг/мкл – у мужчин соответственно) [19]. Эксперименты, проведенные на мышах, показали, что действительно часть ДНК гибнущих клеток, введенных внутривентриально, избегает внутриклеточной деградации и фагоцитоза и циркулирует в крови в форме полимеров, а также частично выводится с мочой в виде кислотонерастворимой формы [20].

Изучение продуктов деградации меченой [<sup>32</sup>P] ДНК фага λ, введенной в брюшную полость мыши,

показало, что большая часть этих продуктов используется клетками повторно или гидролизуется до кислоторастворимых фрагментов, только ~3.2% выводится с мочой в течение 3 дней. Небольшая часть введенной ДНК (0.06%) появляется в кислотонерастворимой фракции нуклеиновых кислот мочи (длинной ≥15–20 п.н.).

Необходимо обратить внимание и на тот факт, что выведение «незащищенных», очищенных от примесей ДНК/РНК и ДНК/РНК из умирающих клеток может быть различным. Некротическая и тем более апоптотическая ДНК связана с белками и защищена от нуклеаз несравненно лучше, чем чистая ДНК, используемая в модельной системе. При этом ДНК/РНК-связывающие белки могут оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на транспорт ДНК/РНК через почечный барьер. В пользу этих предположений может свидетельствовать и то, что в моче мышей, в брюшную полость которых вве-

ли клетки лимфомы человека Raji, апоптоз в которых был индуцирован  $\gamma$ -излучением, обнаружены человеческие Alu-последовательности, отсутствующие в моче контрольных животных (не получавших инъ-екции клеток Raji) [20].

Другое доказательство транспорта циркулирующей ДНК крови в мочу – специфические ДНК Y-хромосомы, обнаруженные в моче женщин, которым перелили кровь доноров-мужчин [20]. Кроме того, в моче женщин, вынашивающих плод мужского пола, также обнаружены специфические ДНК Y-хромосомы [20, 21]. При этом показано, что эмбриональная ДНК в моче матери значительно короче, чем в плазме ее крови [21]. Еще одно подтверждение транспорта полимерной ДНК из крови в мочу получено при анализе внДНК онкологических больных. Известно, что в 80–90% опухолей поджелудочной железы и кишечника обнаруживаются мутантные формы гена *K-ras*, найденные Botezatu и соавт. [20] в составе внеклеточных ДНК в моче больных раком поджелудочной железы (стадия IV) и кишечника (стадии III–IV). Концентрация опухолевой ДНК в моче достаточно высока – мутантный ген *K-ras* обнаружен во внДНК мочи у пяти из восьми больных раком поджелудочной железы и у четырех из пяти больных раком кишечника [20]. Возможность поступления ДНК в мочу из крови доказывают результаты опытов по выявлению в моче больных туберкулезом ДНК *Mycobacterium tuberculosis* [22, 23].

Таким образом, встречающиеся в крови фрагменты ДНК размером 50–100 п.н., по-видимому, частично защищенные гистонами, тем не менее, потенциально могут проникать в мочу из крови. Кроме того, высказано предположение, что связывание ДНК с гистонами, например с H3K27me2, может способствовать экспорту внеклеточной ДНК [24].

Очевидно, что еще одним и, по-видимому, основным источником внДНК и внРНК в моче является апоптоз/некроз клеток мочеполового тракта. Действительно, в норме за сутки в мочу может попадать до  $3 \times 10^6$  клеток эпителия мочевого пузыря и мочевыводящих путей (подсчет по методу Каковского–Аддиса) [25]. Очевидно, что эти клетки и клетки эндотелия частично могут вступать в апоптоз, и фрагментированная апоптотическая ДНК/РНК из этих клеток неизбежно будет попадать в мочу [20]. Действительно, после трансплантации женщинам почек от доноров мужчин концентрация Y-хромосомной ДНК в моче увеличивается при развитии отторжения и возвращается к нормальному уровню при ингибировании иммунной реакции против трансплантата [26–28]. Во внеклеточной ДНК мочи при помощи MALDI-TOF-масс-спектрометрии также обнаружены SNP-аллели донорной почки [29].

Во внеклеточной ДНК мочи больных раком мочеполовой системы выявлены мутации и микросателлитные нарушения, характерные для злокачественных опухолей почки [30] и мочевого пузыря [31–33], абберрантно метилированные ДНК, характерные для опухолей предстательной железы [34, 35] и мочевого пузыря [33, 36–40]. В моче больных с гинекологическими, урологическими заболеваниями или с ВИЧ-инфекцией присутствует ДНК папилломавируса, который поражает глубокие слои кожи и слизистые оболочки внутренних органов [41]. При раке мочевого пузыря во внеклеточной ДНК мочи обнаруживаются последовательности не только геномной, но и митохондриальной ДНК [42].

Концентрация РНК в моче человека составляет 20–140 нг/мл [43, 44]. Доказательством того, что внРНК в моче появляется в результате апоптоза/некроза клеток мочеполового тракта, может служить обнаружение в моче больных раком мочевого пузыря и пациентов с инфекциями мочевыводящих путей мРНК сурвирин, цитокератина 20, муцина 7 и Ki-67 [45, 46]. Данные о транспорте циркулирующей РНК из крови в мочу нам обнаружить не удалось.

Строго говоря, данные о присутствии в моче онко/плодоспецифических НК не позволяют получить прямой ответ на вопрос о том, какая часть внНК образуется за счет апоптоза/некроза клеток, выстилающих мочеполовые пути (следует отметить, что клетки простатического происхождения составляют не более 10% от суммарного пула клеток мочи [47]). Данные о концентрации опухолеспецифических НК в моче и крови больных онкологическими заболеваниями мочеполовой системы свидетельствуют о том, что транспорт опухолеспецифических внНК из крови не является процессом, определяющим концентрацию этих внНК в моче. Действительно, метилированные формы генов *GSTP1* и *RASSF1A* обнаруживаются в моче 15 и 65% больных раком почки и в крови 6 и 11% пациентов соответственно [48], т.е. эти маркерные ДНК не могут поступать из крови в мочу, а, скорее всего, транспортируются непосредственно в мочу. На основании этих и ряда других [49, 50] данных можно уверенно утверждать, что при онкологических заболеваниях мочеполового тракта основная доля онкоспецифических внеклеточных НК поступает в мочу не из крови, а, по-видимому, непосредственно при попадании опухолевых клеток или продуктов их распада в мочевыделительные пути либо в результате диффузии через ткани почки.

### ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И СОСТАВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МОЧИ

По размеру фрагментов внДНК мочи можно условно поделить на две группы: гетерогенная высокомоле-

кулярная (1 т.п.н. и выше) и относительно гомогенная низкомолекулярная ДНК (150–250 п.н.) [20, 43, 51, 52]. В моче обнаружена также низкомолекулярная ДНК размером 10–150 и 150–200 п.н. [53].

Изучению ДНК и РНК бесклеточной фракции мочи посвящены отдельные работы, тогда как в основной массе исследований проводится поиск онкоспецифических маркеров в суммарной моче или только в клетках мочи. В составе вДНК обнаружены практически такие же изменения, характерные для опухолевых ДНК, как и в ДНК, циркулирующих в крови, а именно, точечные мутации, нарушения состава микросателлитов, характерный профиль метилирования онкогенов, присутствие вирусной ДНК [30, 33, 36, 41].

ДНК-маркеры анализировали преимущественно методом ПЦР. Микросателлитные перестройки (в одном или нескольких из 28 маркеров: D1S251, HTPO, D3S1317, D3S587, D3S1560, D3S1289, D3S1286, D3S1038, D4S243, FGA, CSF, АСТВР2, D8S348, D8S307, D9S747, D9S242, IFNa, D9S162, D11S488, THO, vWA, D13S802, MJD, D17S695, D17S654, D18S51, MBP, D21S1245) обнаружены в моче 76% больных с опухолями почек [30]. Хотя бы одно из нарушений микросателлитной ДНК (D4S243, D9S747, D9S171, D17S695, D17S654) обнаружено у 27% больных с опухолями мочевого пузыря [31].

Внеклеточные ДНК с мутациями в гене *FGFR3* обнаружены в моче 34.5% больных раком мочевого пузыря [33], *P53* – у 52.9% больных раком печени [54], *K-ras* – у 95% больных раком кишечника [55].

Аберрантно метилированные ДНК, характерные для клеток опухолей предстательной железы (ген *GSTP1*), найдены в моче 36% больных раком предстательной железы [34, 56] и у 3.2% лиц с доброкачественной гиперплазией предстательной железы [35]. Изменения метилирования обнаружены в ряде генов вДНК мочи больных раком мочевого пузыря: *CDKN2A* (46.7%), *ARF* (26.7%), *GSTP1* (46.7%), *MGMT* (26.7%), *RARβ2* (60%), *TIMP3* (46.7%), *CDH1* (66.7%), *RASSF1A* (53%) и *APC* (53%) [37]. Кроме того, определение статуса метилирования одновременно четырех генов: *MYO3A*, *CA10*, *NKX6*, *SOX11* или *MYO3A*, *CA10*, *NKX6*, *DBC1*, вДНК мочи позволяет детектировать рак мочевого пузыря с высокой чувствительностью (81.3%) и специфичностью (97.3%), а определение статуса метилирования одновременно пяти генов: *MYO3A*, *CA10*, *NKX6*, *DBC1*, *SOX11* или *MYO3A*, *CA10*, *NKX6*, *DBC1*, *PENK*, позволяет выявлять рак мочевого пузыря с чувствительностью 85.2% и специфичностью 94.5% [40].

В моче женщин с патологиями шейки матки ДНК папилломавируса человека типа 16 была обнаружена у 88.8% больных раком, 76.5% пациенток, имею-

щих поражения высокой степени, и у 45.5% больных с поражениями низкой степени [57]. В моче больных раком предстательной железы, получивших хирургическое лечение, папилломавирусная ДНК обнаружена в 50% случаев [58].

Что касается маркерной внеклеточной РНК, то у двух из четырех больных раком мочевого пузыря и у двух из четырех пациентов с инфекциями мочевыводящих путей при помощи количественной ОТ-ПЦР обнаружена специфическая мРНК Ki-67, не найденная в моче пяти здоровых доноров [46]. Кроме того, методом ОТ-ПЦР в моче больных раком мочевого пузыря обнаружены мРНК сурвирина (чувствительность 90.4%, специфичность 94.7%), цитоцератина 20 (чувствительность 82.6%, специфичность 97.4%) и муцина 7 (чувствительность 62.6%, специфичность 94.7%) ( $P < 0.001$ ). Комбинация этих трех маркеров позволяет выявлять рак мочевого пузыря с чувствительностью 100% при специфичности анализа 89.5% [45].

Определение концентрации мРНК CD147, BIGH3, STMN1 в бесклеточном супернатанте мочи (после центрифугирования суммарной мочи при 10000 об/мин) показало, что у пациентов с уротелиальным раком мочевого пузыря концентрация этих мРНК в 2–67 раз выше, чем у здоровых доноров [59].

Перспективный маркер, специфически экспрессирующийся при раке предстательной железы, – мРНК АМАСР (*α-methylacyl coenzyme A racemase*). Детекция мРНК АМАСР в осадке мочи 92 мужчин, из которых у 43 диагностирован рак предстательной железы, позволяет выявлять больных с чувствительностью 70% и специфичностью 71%, тогда как определение мРНК РСА3 обеспечивает чувствительность 72% и специфичность 59% [60]. Одновременное определение мРНК АМАСР и РСА3 повышает чувствительность и специфичность теста до 81 и 84% соответственно.

Анализ соотношения мРНК ETS2 (*v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2*) и мРНК uPA (*urokinase plasminogen activator*) во внеклеточной РНК в суммарной моче (без центрифугирования/осаждения клеток) позволил диагностировать рак мочевого пузыря со 100% специфичностью и 75.4% чувствительностью [61].

Однако использование мРНК мочи для разработки систем диагностики различных заболеваний до сих пор представляет довольно сложную задачу, поскольку моча содержит большое количество нуклеаз, в том числе и РНКаз (их разнообразие описано в следующей главе). Высокая концентрация ферментов, гидролизующих РНК, осложняет работу с внеклеточными РНК, в том числе и на стадии выделения. В отличие от длинных молекул мРНК, микроРНК

более устойчивы к атакам нуклеаз в связи со своим небольшим размером (20–25 нуклеотидов), способностью формировать прочные комплексы с биополимерами или упаковываться в различные микро-частицы, например, экзосомы [4]. Действительно в моче обнаружены m-, sca-, sno-, sn-, pi-, miРНК, в том числе и в составе экзосом [4, 62]. Основываясь на этих данных, все больше исследователей пытаются разработать тест-системы для диагностики различных онкологических заболеваний путем анализа микроРНК в моче.

Так, например, показано, что соотношение концентрации микроРНК-126 и микроРНК-152 в моче позволяет обнаружить рак мочевого пузыря со специфичностью 82% и чувствительностью 72% [63]. Определение концентраций микроРНК-210, -10b и -183 повышает специфичность детекции рака мочевого пузыря до 91% при чувствительности не менее 71% [64].

В моче здоровых доноров, онкологических больных и беременных женщин обнаружено более 204 микроРНК, отличающихся в этих группах, часть из которых может быть потенциальными маркерами (например, miR-515-3p, 335, 892a, 509-5p, 223\*, 873, 302d, 616\*, 134) [44].

Обнаружено, что уровень экспрессии микроРНК 483-5p в бесклеточной фракции мочи статистически значимо повышен (критерий Манна–Уитни,  $P = 0.013$ ) при раке предстательной железы [65].

Исследование микроРНК, относящихся к эпителиально-мезенхимальному переходу (EMT, epithelial-mesenchymal transition) [66], в осадке и супернатанте мочи у 51 больного раком мочевого пузыря и 24 здоровых доноров выявило уменьшение количества семейства микроРНК-200, микроРНК-192 и -155 в осадке, а также снижение экспрессии микроРНК-192 и повышение экспрессии микроРНК-155 в супернатанте мочи больных. Кроме того, уровень экспрессии семейства микроРНК-200, микроРНК-205 и микроРНК-192 в осадке мочи больных статистически значимо коррелировал с экспрессией маркеров EMT в моче, включая mРНК E-боксысвязывающего гомеобокса 1 с цинковыми пальцами (zinc finger E-box-binding homeobox 1), виментина, трансформирующего фактора роста 1 и гена гомолога семейства Ras (член A). Обнаружено, что уровни микроРНК-200с и микроРНК-141 в осадке мочи больных нормализуются после удаления опухоли мочевого пузыря.

### **ДНК- И РНК-ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ МОЧИ**

Моча человека представляет собой подходящую среду для функционирования НК-гидролизующих ферментов: суточная моча взрослого человека содержит 2.0–4.0 г калия, 100–400 мг кальция, 50–150 мг маг-

ния, 3–6 г натрия, 270–850 мкг цинка [25], величина рН мочи в норме варьирует от 5.0 до 7.0.

Основным ДНК-гидролизующим ферментом в моче, как и в крови [1], является ДНКазы I [67–70], причем ее активность в моче превышает активность в сыворотке крови более чем в 100 раз [71] и составляет 400÷1200 ед. акт./л (удельная активность ДНКазы I – 2000 ед. акт./мг, в крови  $4.4 \pm 1.8$  ед. акт./л). Внеклеточную ДНК в моче могут гидролизовать все изоформы ДНКазы I, которые, как известно, отличаются по значению pI, первичной структуре и/или по содержанию сиаловой кислоты [72]. Кроме того, сообщалось о генетическом полиморфизме ДНКазы I в моче [69]. На мышинной модели показано, что концентрация ДНКазы I в моче может значительно повышаться при развитии системной красной волчанки (от 24 до 521 нг/мл), тем самым косвенно отражая нарушения, происходящие в организме [73]. В крови активность ДНКазы I ингибируется актином [68, 74, 75], однако в моче концентрация актина, по-видимому, существенно ниже, чем в крови (концентрацию актина определяют по концентрации 3-метилгистидина, специфического метаболита актина и миозина) [76].

ДНКазы II [70, 71, 77] также обнаруживаются в моче. Активность ДНКазы II в моче человека приблизительно в 30 раз ниже, чем ДНКазы I [77]. При этом активность этого фермента примерно в 1.5–5 раз выше, чем в крови [78], и составляет примерно 13–40 ед. акт./л мочи.

Наряду с ДНКазы в моче присутствует и фосфодиэстераза I, имеющая рН-оптимум 9.0 (фермент стабилен при рН от 3.0 до 11.0) [71, 79].

Что же касается РНК-гидролизующих ферментов мочи, то, к сожалению, работы по их исследованию велись, в основном, в прошлом веке (70-е–90-е гг.). РНКазы 2 – наиболее представлена в моче человека, где ее примерно в 20 раз больше, чем РНКазы I. Молекулярная масса РНКазы 2, определенная методами электрофореза в SDS-PAGE и гель-фильтрацией, составляет 32 и 38 кДа соответственно, рН-оптимум находится в диапазоне 7.2–7.6 [80].

Рибонуклеаза I (РНКазы I) – второй по представленности РНК-гидролизующий фермент мочи [81]. Молекулярная масса этого фермента составляет ~16 кДа, фермент активен при рН 7.0 и ингибируется ионами  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ . РНКазы I является пиримидин-специфичным ферментом, более эффективно гидролизует поли(С) и поли(U), в отличие от поли(А) и поли(G). Кроме того, РНКазы I способна гидролизовать гетеродуплексы РНК:ДНК [82].

Наряду с РНКазы 2 и I в моче человека обнаружены РНКазы С и U с рН-оптимумами 8.5 и 7.0 соответственно [83], а также РНКазы 7, UL, US, UrI-

1 и UrI-2. РНКазы С (33 кДа) представляет собой гликопротеин, предпочтительно гидролизующий синтетический гомополимер поли(С), аналогичный РНКазам поджелудочной железы млекопитающих. РНКазы U (18 кДа) также является гликопротеином, использует в качестве субстрата РНК, но практически не активна в отношении поли(С) и обладает меньшей гомологией с РНКазой поджелудочной железы. По аминокислотному составу этот фермент сходен с РНКазой селезенки человека. РНКазы с молекулярной массой 33 [84] и 21.5 кДа [85], рН-оптимумом 6.5 и более эффективным гидролизом поли(С) обнаружены в моче человека и другими исследователями. РНКазы 7 (14.5 кДа) присутствует в моче в концентрации 235–3467.2 мг/л [86]. РНКазы 7 проявляет антибактериальную активность при щелочных значениях рН.

Пиримидин-специфичные РНКазы UL (38 кДа) и US (13 кДа), имеющие рН-оптимумы 8.0 и 6.75 соответственно, обнаружены в моче взрослых индивидов [87]. В моче беременных женщин обнаружены РНКазы UrI-1 (34 кДа) и UrI-2 (38 кДа) с рН-оптимумами 7.7 и 6.6 соответственно [88].

Таким образом, внеклеточные ДНК и РНК гетерогенны по своему размеру и составу. В мочу они могут поступать как из крови, так и из клеток мочеполовой системы преимущественно в результате апоптоза, некроза, онкоза и активной секреции (в составе экзосом). Биологические функции внеклеточных нуклеиновых кислот мочи не исследованы, однако ДНК, РНК и малые РНК представляют интерес для ранней неинвазивной диагностики онкологических заболеваний различной этиологии. ●

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bryzgunova O., Laktionov P. // *Biochemistry (Moscow). Supplement Series B: Biomed. Chem.* 2014. V. 8. P. 203–219.
- Fleischhacker M., Schmidt B. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1775. P. 181–232.
- van der Vaart M., Pretorius P. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1137. P. 18–26.
- Li M., Zeringer E., Barta T., Schageman J., Cheng A., Vlassov A. // *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2014. V. 369. P. 20130502.
- Sita-Lumsden A., Fletcher C., Dart D., Brooke G., Waxman J., Bevan C. // *Biomark. Med.* 2013. V. 7. P. 867–877.
- Rykova E., Morozkin E., Ponomaryova A., Loseva E., Zaporozhchenko I., Cherdynseva N., Vlassov V., Laktionov P. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2012. V. 12. Suppl 1. P. S141–S153.
- Покровский В., Коротько Г. *Физиология человека. М.: Медицина, 1997. С. 277–280.*
- Lote C. *Principles of Renal Physiology.* London: Chapman & Hall, 1994. P. 33–44.
- Tencer J., Frick I., Oquist B., Alm P., Rippe B. // *Kidney Int.* 1998. V. 53. P. 709–715.
- Holdenrieder S., Stieber P., Bodenmüller H., Busch M., von Pawel J., Schalhorn A., Nagel D., Seidel D. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001. V. 945. P. 93–102.
- Kiroi K., Tanaka C., Toi M. // *Breast Cancer.* 1999. V. 6. P. 361–364.
- Lin J., Fan R., Zhao Z., Cummings O., Chen S. // *Am. J. Surg. Pathol.* 2013. V. 37. P. 539–547.
- Ng E., Tsui N., Lam N., Chiu R., Yu S., Wong S., Lo E., Rainer T., Johnson P., Lo Y. // *Clin. Chem.* 2002. V. 48. P. 1212–1217.
- Halicka H., Bedner E., Darzynkiewicz Z. // *Exp. Cell Res.* 2000. V. 260. P. 248–256.
- Hasselmann D., Rappl G., Tilgen W., Reinhold U. // *Clin. Chem.* 2001. V. 47. P. 1488–1489.
- Gahan P., Stroun M. // *Cell Biochem. Funct.* 2010. V. 28. P. 529–538.
- Vickers K., Palmisano B., Shoucri B., Shamburek R., Remaley A. // *Nat. Cell Biol.* 2011. V. 13. P. 423–433.
- Sorenson G. // *Clin. Cancer Res.* 2000. V. 6. P. 2129–2137.
- Simkin M., Abdalla M., El-Mogy M., Haj-Ahmad Y. // *Epigenomics.* 2012. V. 4. P. 343–352.
- Botezatu I., Serdyuk O., Potapova G., Shelerov V., Alechina R., Molyaka Y., Anan'ev V., Bazin I., Garin A., Narimanov M., et al. // *Clin. Chem.* 2000. V. 46. P. 1078–1084.
- Koide K., Sekizawa A., Iwasaki M., Matsuoka R., Honma S., Farina A., Saito H., Okai T. // *Prenatal Diagnosis.* 2005. V. 25. P. 604–607.
- Tuuminen T. // *Front. Immunol.* 2012. V. 3. P. 1–6.
- Peter J., Green C., Hoelscher M., Mwaba P., Zumla A., Dheda K. // *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2010. V. 16. P. 262–270.
- Peters D., Pretorius P. // *Clin. Chim. Acta.* 2011. V. 412. P. 806–811.
- Чиркин А., Окоороков А., Гончарик И. *Диагностический справочник терапевта.* Минск, 1993. 688 с.
- Zhang J., Tong K., Li P., Chan A., Yeung C., Pang C., Wong T., Lee K., Lo D. // *Clin. Chem.* 1999. V. 45. P. 1741–1746.
- Zhong X., Hahn D., Troeger C., Klemm A., Stein G., Thomson P., Holzgreve W., Hahn S. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001. V. 945. P. 250–257.
- Zhang Z., Ohkohchi N., Sakurada M., Mizuno Y., Miyagi T., Satomi S., Okazaki H. // *Transplantation Proc.* 2001. V. 33. P. 380–381.
- Li Y., Hanh D., Wenzel W., Hanh S., Holzgreve F. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006. V. 1075. P. 144–147.
- Eisenberger C., Schoenberg M., Enger C., Hortopan S., Shah S., Chow N., Marshall F., Sidransky D. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1999. V. 91. P. 2028–2032.
- Utting M., Werner W., Dahse R., Schubert J., Junker K. // *Clin. Cancer Res.* 2002. V. 8. P. 35–40.
- Mao L., Lee D., Tockman M., Erozan Y., Askin F., Sidransky D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 9871–9875.
- Karnes R., Fernandez C., Shuber A. // *Mayo Clin. Proc.* 2012. V. 87. P. 835–839.
- Goessl C., Krause H., Muller M., Heicappell R., Schrader M., Sachsinger J., Miller K. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 5941–5945.
- Jeronimo C., Usadel H., Henrique R., Silva C., Oliveira J., Lopes C., Sidransky D. // *Urology.* 2002. V. 60. P. 1131–1135.
- Goessl C., Muller M., Straub B., Miller K. // *Eur. Urology.* 2002. V. 41. P. 668–676.
- Hoque M., Begum S., Topaloglu O., Chatterjee A., Rosenbaum E., Crikings W., Westra W., Schoenberg M., Zahurak

- M., Goodman S., Sidransky D. // *J. Nat. Cancer Inst.* 2006. V. 98. P. 996–1004.
38. Reinert T., Modin C., Castano F., Lamy P., Wojdacz T., Hansen L., Wiuf C., Borre M., Dyrskjot L., Orntoft T. // *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 17. P. 5582–5592.
39. Reinert T. // *Adv. Urol.* 2012. V. 2012. P. 503271.
40. Chung W., Bondaruk J., Jelinek J., Lotan Y., Liang S., Czerniak B., Issa J. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2011. V. 20. P. 1483–1491.
41. Vorsters A., Micalessi I., Bilcke J., Ieven M., Bogers J., van Damme P. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012. V. 31. P. 627–640.
42. Ziegler A., Zangemeister-Wittke U., Stahel R. // *Cancer Treatment Rev.* 2002. V. 28. P. 255–271.
43. Bryzgunova O., Skvortsova T., Kolesnikova E., Starikov A., Rykova E., Vlassov V., Laktionov P. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006. V. 1075. P. 334–340.
44. Weber J., Baxter D., Zhang S., Huang D., Huang K., Lee M., Galas D., Wang K. // *Clin. Chem.* 2010. V. 56. P. 1733–1741.
45. Pu X., Wang Z., Chen Y., Wang X., Wu Y., Wang H. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2008. V. 134. P. 659–665.
46. Menke T., Warnecke J. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004. V. 1022. P. 185–189.
47. Truong M., Yang B., Jarrard D. // *J. Urology.* 2013. V. 189. P. 422–429.
48. Hoque M., Begum S., Topaloglu O., Jeronimo C., Mambo E., Westra W., Califano J., Sidransky D. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 5511–5517.
49. Payne S., Serth J., Schostak M., Kamradt J., Strauss A., Thelen P., Model F., Day J., Liebenberg V., Morotti A., et al. // *Prostate.* 2009. V. 69. P. 1257–1269.
50. Goessl C., Muller M., Heicappell R., Krause H., Miller K. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001. V. 945. P. 51–58.
51. Su Y., Wang M., Brenner D., Ng A., Melkonyan H., Umansky S., Syngal S., Block T. // *J. Mol. Diagn.* 2004. V. 6. P. 101–107.
52. Su Y., Wang M., Aiampitumrit B., Brenner D., Block T. // *Cancer Biomarkers.* 2005. V. 1. P. 177–182.
53. Melkonyan H., Feaver W., Meyer E., Scheinker V., Shekhtman E., Xin Z., Umansky S. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1137. P. 73–81.
54. Lin S., Dhillon V., Jain S., Chang T., Hu C., Lin Y., Chen S., Chang K., Song W., Yu L., et al. // *J. Mol. Diagn.* 2011. V. 13. P. 474–484.
55. Su Y., Wang M., Brenner D., Norton P., Block T. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1137. P. 197–206.
56. Bryzgunova O., Morozkin E., Yarmoschuk S., Vlassov V., Laktionov P. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1137. P. 222–225.
57. Daponte A., Pournaras S., Mademtzis I., Hadjichristodoulou C., Kostopoulou E., Maniatis A., Messinis I. // *J. Clin. Virol.* 2006. V. 36. P. 189–193.
58. Zambrano A., Kalantari M., Simoneau A., Jensen J., Villarreal L. // *Prostate.* 2002. V. 53. P. 263–276.
59. Bhagirath D., Abrol N., Khan R., Sharma M., Seth A., Sharma A. // *Clin. Chim. Acta.* 2012. V. 413. P. 1641–1646.
60. Ouyang B., Bracken B., Burke B., Chung E., Liang J., Ho S. // *J. Urol.* 2009. V. 181. P. 2508–2513.
61. Hanke M., Kausch I., Dahmen G., Jocham D., Warnecke J. // *Clin. Chem.* 2007. V. 53. P. 2070–2077.
62. Miranda K., Bond D., McKee M., Skog J., Paunescu T., Silva N., Brown D., Russo L. // *Kidney Int.* 2010. V. 78. P. 191–199.
63. Hanke M., Hoefig K., Merz H., Feller A., Kausch I., Jocham D., Warnecke J., Sczakiel G. // *Urol. Oncology.* 2009. V. 28. P. 665–661.
64. Eissa S., Matboli M., Hegazy M., Kotb Y., Essawy N. // *Transl Res.* 2015. pii. S1931-5244(15)00003-1.
65. Korzeniewski N., Tosev G., Pahernik S., Hadaschik B., Hohenfellner M., Duensing S. // *Urol. Oncol.* 2015. V. 33. P. 16.e17–22.
66. Wang G., Chan E., Kwan B., Li P., Yip S., Szeto C., Ng C. // *Clin. Genitourin. Cancer.* 2012. V. 10. P. 106–113.
67. Dittmar M., Bischofs C., Matheis N., Poppe R., Kahaly G. // *J. Autoimmun.* 2009. V. 32. P. 7–13.
68. Eulitz D., Mannherz H. // *Apoptosis.* 2007. V. 12. P. 1511–1521.
69. Kishi K., Yasuda T., Ikehara Y., Sawazaki K., Sato W., Iida R. // *Am. J. Hum. Genet.* 1990. V. 47. P. 121–126.
70. Ito K., Minamiura N., Yamamoto T. // *J. Biochem.* 1984. V. 95. P. 1399–1406.
71. Nadano D., Yasuda T., Kishi K. // *Clin. Chem.* 1993. V. 39. P. 448–452.
72. Yasuda T., Awazu S., Sato W., Iida R., Tanaka Y., Kishi K. // *J. Biochem.* 1990. V. 108. P. 393–398.
73. Macanovic M., Lachmann P. // *Clin. Exp. Immunol.* 1997. V. 108. P. 220–226.
74. Mannherz H. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 11661–11664.
75. Hitchcock S. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. P. 5668–5673.
76. Calles-Escandon J., Cunningham J., Snyder P., Jacob R., Huszar G., Loke J., Felig P. // *Am. J. Physiol.* 1984. V. 246. P. e334–338.
77. Murai K., Yamanaka M., Akagi K., Anai M. // *J. Biochem.* 1980. V. 87. P. 1097–1103.
78. Yasuda T., Takeshita H., Nakazato E., Nakajima T., Hosomi O., Nakashima Y., Kishi K. // *Anal. Biochem.* 1998. V. 255. P. 274–276.
79. Ito K., Yamamoto T., Minamiura N. // *J. Biochem.* 1987. V. 102. P. 359–367.
80. Mizuta K., Yasuda T., Ikehara Y., Sato W., Kishi K. // *Z. Rechtsmed.* 1990. V. 103. P. 315–322.
81. Yasuda T., Sato W., Kishi K. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1988. V. 965. P. 185–194.
82. Potenza N., Salvatore V., Migliozi A., Martone V., Nobile V., Russo A. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 2906–2913.
83. Cranston J., Perini F., Crisp E., Hixson C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1980. V. 616. P. 239–258.
84. Rabin E., Weinberger V. // *Biochem. Med.* 1975. V. 14. P. 1–11.
85. Reddi K. // *Prep. Biochem.* 1977. V. 7. P. 283–299.
86. Spencer J., Schwaderer A., Dirosario J., McHugh K., McGilivray G., Justice S., Carpenter A., Baker P., Harder J., Hains D. // *Kidney Int.* 2011. V. 80. P. 174–180.
87. Iwama M., Kunihiro M., Ohgi K., Irie M. // *J. Biochem.* 1981. V. 89. P. 1005–1016.
88. Sakakibara R., Hashida K., Kitahara T., Ishiguro M. // *J. Biochem.* 1992. V. 111. P. 325–330.