

© БУРДАШКИНА К.Г., БЫЧКО Г.Н., КИРКОВСКИЙ В.В., РИНЕЙСКАЯ О.Н., 2016

DOI: <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2016.6.21>

ПРОДУКТЫ ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕОЛИЗА: ПОДХОДЫ К ОБНАРУЖЕНИЮ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ В ОЦЕНКЕ ТЯЖЕСТИ ПАТОЛОГИИ ПРИ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

БУРДАШКИНА К.Г., БЫЧКО Г.Н., КИРКОВСКИЙ В.В., РИНЕЙСКАЯ О.Н.

Белорусский государственный медицинский университет, г.Минск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2016. – Том 15, №6. – С. 21-27.

RESTRICTED PROTEOLYSIS PRODUCTS: APPROACHES TO THE DETECTION AND DIAGNOSTIC MEANS FOR THE EVALUATION OF THE PATHOLOGY SEVERITY IN ENDOGENOUS INTOXICATION

BURDASHKINA K.G., BYCHKO G.N., KIRKOVSKY V.V., RINEYSKAYA O.N.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2016;15(6):21-27.

Резюме.

Обзорная статья посвящена актуальной проблеме оценки тяжести течения патологического процесса при состояниях, сопровождаемых эндогенной интоксикацией. В статье рассмотрены различные методологические подходы к определению среднемолекулярной пептидной фракции как основного маркера эндотоксемии. Представлены современные данные количественного и качественного анализа белково-пептидных компонентов плазмы крови по гидрофильности/гидрофобности, особенности функционирования протеиназо-ингибиторной системы при различных типах патологии. Анализ характера молекулярно-массового распределения продуктов промежуточного белкового обмена позволит повысить степень надежности диагностики патологического процесса и контроль эффективности проводимых детоксикационных мероприятий.

Ключевые слова: продукты ограниченного протеолиза, протеиназо-ингибиторная система, эндогенная интоксикация.

Abstract.

The review article is devoted to the urgent problem of the evaluation of the pathological process course severity in conditions accompanied by endogenous intoxication.

Various methodological approaches to the middle molecular peptide fraction determination as the main marker of endotoxemia are considered in this article. Modern data on quantitative and qualitative analysis of protein-peptide components in blood plasma by hydrophilic/hydrophobic properties, the peculiarities of proteinase-inhibitor system functioning in different types of pathology are presented. The analysis of molecular weight distribution nature of the products of intermediate protein metabolism will enable the increase of the reliability of the pathological process diagnosis and detoxication measures effectiveness monitoring.

Key words: restricted proteolysis products, proteinase-inhibitor system, endogenous intoxication.

Основной причиной тяжелых воспалительно-дегенеративных заболеваний являются достаточно однотипные метаболические нарушения. Одними из наиболее распространенных из них являются нарушения проницаемости ци-

топлазматических и базальных мембран, приводящие к нелимитированной активации протеолитической системы. При этом в жидкостных средах и тканях организма в нефизиологических концентрациях накапливаются промежуточные

и конечные продукты нарушенного белкового обмена, способные оказывать токсическое влияние на функции различных органов и систем [1, 2, 3].

Среди широкого круга метаболитов, вызывающих повреждающее действие на организм, особое внимание привлекает класс среднемолекулярных пептидов (СМП) – продуктов ограниченного протеолиза, так называемых «средних молекул» [3, 4]. Они обладают выраженными патобиологическими и патофизиологическими эффектами, которые проявляются на молекулярном, клеточном и системном уровнях. В связи с тем, что подавляющее большинство описанных случаев обнаружения в плазме крови СМП относится к различного рода нефропатиям, в доступной нам литературе часто употребляются также термины «уремические пептиды» или «уремические токсины пептидной природы» [4].

С развитием «гипотезы средних молекул», разработанной Babb и Scribner в начале 1970-х, молекулярная масса стала основным критерием, характеризующим обширную группу недифференцированных соединений. Так, первоначально термин «средние молекулы» был предложен для компонентов плазмы крови с молекулярной массой 300-5000 Дальтон (Да) [5].

В настоящее время с применением современных аналитических технологий стало возможным классифицировать уремические токсины с учетом физико-химических характеристик, включающих не только молекулярную массу, но и полярность, связывание с белками, химическую структуру. Таким образом, были выделены: свободные гидрофильные низкомолекулярные соединения ($MM < 500$ Да); гидрофильные низкомолекулярные, связанные с белками (в большинстве своем также с $MM < 500$ Да); среднемолекулярные, не связанные с белками ($500 < MM < 3000-12000$ Да) и высокомолекулярные ($MM > 12000$ Да) соединения [6].

Дисбаланс функционирования протеиназо-ингибиторной системы характерен для многих тяжелых заболеваний [7, 8, 9]. При этом эффективная нейтрализация гиперактивированных протеолитических ферментов за счет потенциала эндогенных ингибиторов оказывается недостаточной. В этом случае метаболические реакции обмена веществ приобретают резко выраженный катаболический характер, а объектом для атаки гиперактивированных протеиназ

становятся собственные белки организма, что и приводит к накоплению в жидкостных средах среднемолекулярных пептидных фракций.

В настоящее время многими исследователями признается, что процесс избыточного образования и накопления в организме СМП в концентрациях, превышающих физиологические значения, во многом способствует развитию симптоматики ЭИ, а степень увеличения уровня этих соединений при разворачивании патологического процесса является, таким образом, универсальным маркером интоксикации, реально отражающим состояние извращенного белкового метаболизма [10, 11, 12]. Патологические сдвиги гемодинамики, ДВС-синдром, нефропатии, иммунодепрессии, энцефалопатии – это далеко не полный перечень комплекса симптомов ЭИ, связанных с нарушением обмена веществ, опосредованных гиперактивацией протеолиза. Поэтому определение уровня СМП в жидкостных средах организма (плазма, сыворотка, лимфа, ликвор, моча) позволяет четко определить степень и выраженность ЭИ при широком круге патологических состояний и адекватно оценивать эффективность патогенетической терапии и проводимых детоксикационных процедур [13, 14].

В комплексной терапии критических состояний, сопровождающихся ЭИ и часто осложненных полиорганной недостаточностью, крайне важна оперативная и объективная оценка состояния пациента. Это необходимо как для своевременного составления показаний для включения в терапию экстракорпоральных методов детоксикации и гемокоррекции (гемосорбция, гемофильтрация, гемодиализ, плазмадиализ, плазмаферез и т.д.), так и эффективности их осуществления [15, 16].

Вопросы методологии определения СМП в плазме и сыворотке крови не теряют актуальности и сегодня. Так, существует несколько базовых методов экспресс-диагностики уровня пептидемии и многочисленные их модификации, создаваемые с целью повышения точности, информативности и оперативности определения этого показателя [17, 18, 19].

Разработанный в 1985 году в лаборатории под руководством Габриэлян Н.И. экспресс-метод определения СМП основан на прямой спектрофотометрии депротеинизированной трихлоруксусной кислотой (ТХУ) плазмы крови при 254 нм. Однако к недостаткам

данного метода следует отнести то, что сама ТХУ имеет высокий коэффициент поглощения в УФ-области, перекрывающий диапазон детектирования СМП; длина волны измерения 254 нм не характерна для пептидной связи; в трихлоруксусном супернатанте помимо СМП содержится большое количество УФ-активных непептидных компонентов сыворотки и плазмы крови и др. Эти обстоятельства существенно изменяют реальный уровень продуктов промежуточного обмена белков.

В настоящее время разработаны многочисленные модификации этого метода, различающиеся типом используемых для депротеинизации плазмы кислот (ТХУ или хлорная кислота (HClO_4)) и их концентрацией (10%, 15%, 24% для ТХУ, 1,2N, 1,8N – для HClO_4 (где N – нормальная концентрация в моль-экв./л)), длиной волны спектрофотометрического детектирования (210, 230, 254, 280 нм), степенью разведения образца в процессе осуществления этих методик. Вместе с тем, все эти модификации, как и базовый метод, имеют один общий существенный недостаток – выражение конечного результата в условных единицах оптической плотности. При этом цифровые значения, выражающиеся в условных единицах, даже в норме резко отличаются друг от друга – 0,260 усл. ед. [17], 10,2 усл. ед. [19], 1,18 усл. ед. [21], 249 усл. ед. [22].

Естественно, столь значительный разброс величин тестируемого показателя приводит к низкой сопоставимости результатов получаемых в различных клинично-диагностических лабораториях и не позволяет создать единую унифицированную базу данных уровня пептидемии при патологических состояниях, сопровождающихся симптоматикой ЭИ.

Осаждение белков сильными кислотами (ТХУ, HClO_4) является классическим приемом депротеинизации биологических жидкостей. Вместе с тем при ряде остро развивающихся патологических состояний в плазме накапливается большое количество кислотоустойчивых соединений белковой природы (белки острой фазы воспаления), не осаждаемых кислотами [18, 23]. Присутствие их в супернатанте существенно искажает результат определения пептидных компонентов. И если для ТХУ, имеется существенное препятствие по использованию в качестве осадителя белков в силу ее высокой оптической активности в УФ-области, характерной для пептидной связи, то хлорная кисло-

та лишена этого недостатка.

В 1991 г. был разработан метод определения СМП [23], сочетающий в себе прием осаждения белков хлорной кислотой и доосаждение кислотостабильных компонентов этиловым спиртом, позволяющий депротеинизировать плазму или сыворотку для последующего спектрофотометрического детектирования при длине волны 210 нм, максимально приближенной к поглощению пептидной связи. Данный подход также позволяет оценивать уровень СМП количественно в отличие от многих иных приемов и их модификаций, характеризующих данный показатель в условных величинах – единицах оптической плотности (ед. ОП). Вместе с тем, несмотря на высокую точность, воспроизводимость, количественное выражение конечного результата, эта методика достаточно длительна, что делает этот метод приемлемым для научных исследований и мало пригодным для экспресс-диагностики.

Необходимо также учитывать то обстоятельство, что современная диагностика неотложных состояний проводится на стандартизованном лабораторном оборудовании с использованием приемов, не занимающих много времени и требующих минимального объема биологического образца. Так, наилучшее разрешение пептидных фракций обеспечивают хроматографические методы разделения (газовая и высокоэффективная жидкостная хроматография) и капиллярный электрофорез [24]. Газовая хроматография не пригодна для количественного анализа средних и длинных пептидов, а капиллярный электрофорез не может обеспечить воспроизводимость разделения при рутинном анализе. Эффективное разрешение достигается также при использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии, которая лишена перечисленных выше недостатков. Наиболее распространенными типами жидкостной хроматографии являются обращенно-фазная [25], где в качестве неподвижной фазы используют углеродную цепь различной длины, прикрепленную к сферическому носителю размером, как правило, в 3–5 мкм, и гель-хроматография на носителях типа сефадекс [26].

С развитием аналитических технологий в биохимии набирают обороты так называемые «омные тесты» [27]. Наступление «постгеномной эры» ознаменовало выяснение того, как генетическая информация реализуется на других

уровнях организации биологического объекта – транскриптомном, протеомном, метаболомном, и, в конечном счете, проявляется в фенотипе человека и его здоровье. Так, протеомика изучает белковый состав биологических объектов, а также модификации и структурно-функциональные свойства белковых молекул, а метаболомика – совокупность низкомолекулярных веществ, являющихся субстратами, интермедиатами, продуктами биохимических реакций [28].

Современная метаболомика наиболее перспективна в плане клинического применения, так как характеризуется использованием методов, основанных на масс-спектрометрии, – метаболомическом фингерпринтинге (классификация биопроб на основе паттернов, формируемых количественными характеристиками входящих в них метаболитов) и метаболомическом профилировании (исследуются не метаболиты в отдельности, а группы метаболитов) [29]. Полученные в результате масс-спектры метаболитов подвергаются биоинформатизационной обработке и формируют базы данных, которые постоянно обновляются [30]. Однако вопросы применения метаболомных технологий в клинико-лабораторной диагностике в отечественной литературе не рассматривались в виду сложности технической реализации и дорогостоящей технологии.

Следует особо отметить, что большинство фундаментальных исследований, касающихся разработки новых доступных методов количественного определения СМП в плазме крови при ЭИ, включали определение гидрофильной фракции. Вместе с тем установлено, что не менее важную роль в формировании патогенеза ряда заболеваний играют гидрофобные пептиды, которые сорбируются на цитоплазматических мембранах клеток и на поверхности транспортных белков плазмы крови [31]. К настоящему времени известно, что при ряде заболеваний более выраженные токсичные свойства проявляет именно гидрофобная фракция СМП, благодаря своему высокому сродству к биологическим структурам [32]. Подтверждением накопления гидрофобных лигандов при ЭИ может служить снижение связывающей способности альбумина в плазме крови таких пациентов по отношению к гидрофобным красителям (нильский красный, 8-анилинонафталин-1-сульфонат), что связано с уменьшением свободных центров сорбции белка [33, 34]. Так, методом флуоресцентного зондирования были показаны нарушения функциональ-

ных свойств альбумина в крови пациентов при артритах [35], дислипидемии [36] и другие. Однако систематических исследований, связанных с разработкой и совершенствованием методов выделения, количественного и качественного анализа гидрофобных пептидов, образующихся в плазме у пациентов при ЭИ, на большом клиническом материале не проводилось.

Как уже было сказано, при развитии синдрома ЭИ запускается механизм неконтролируемой активации протеолиза с угнетением его естественных ингибиторов [37]. Однако сведения о содержании основных ингибиторов (α_1 -антитрипсина, α_2 -макроглобулина) в плазме крови при различных патологических состояниях разнонаправлены [38, 39]. Это свидетельствует о том, что механизм действия протеиназо-ингибиторной системы при ЭИ недостаточно изучен. Белковые молекулы подвергаются существенным перестройкам в результате интенсификации протеолитических процессов, комплексообразований фермент-субстрат и фермент-ингибитор, что должно отразиться на флуоресценции хромофорных аминокислотных остатков реагирующих веществ [40]. В этой связи не лишним будет исследовать корреляционные взаимосвязи между содержанием и спектральными характеристиками белково-пептидных компонентов и протеиназо-ингибиторной системой плазмы крови у пациентов при ЭИ.

Заключение

Таким образом, для объективной характеристики течения патологического процесса при ЭИ представляется важным параллельное изучение состояния баланса протеиназо-ингибиторной системы и установление возможной взаимосвязи между показателями протеолитической и ингибиторной активности и уровнем лигандизации транспортных белков. Безусловно, оценка характера молекулярно-массового распределения белково-пептидных компонентов и уровня пептидемии как показателя степени эндотоксемии при патологических состояниях, сопровождающихся тяжелыми нарушениями обменных процессов, высоко информативна не только в плане диагностики, но и позволяет адекватно оценивать эффективность проводимых детоксикационных мероприятий. В условиях интенсивного развития новых аналитических технологий и инструментальных методов исполнения кли-

нической лабораторной диагностики, представляется перспективным создание оперативного, сочетанного метода оценки тяжести патологических состояний по изменению характера молекулярно-массового распределения белков и продуктов их ограниченного протеолиза, а также определения соотношения гидрофобных и гидрофильных среднемолекулярных пептидных компонентов плазмы крови.

Литература

1. Виткина, Т. И. Средние молекулы в оценке уровня эндогенной интоксикации при хроническом необструктивном бронхите / Т. И. Виткина // Здоровье. Мед. экология. Наука. – 2014. – № 2. – С. 70–72.
2. Пептиды группы «средних молекул» / С. Г. Галактионов [и др.] // Биоорганическая химия. – 1984. – Т. 10, № 1. – С. 5–17.
3. Vanholder, R. The middle-molecule hypothesis 30 years after: lost and rediscovered in the universe of uremic toxicity? / R. Vanholder, S. Van Laecke, G. Glorieux. – J. Nephrol. – 2008 Mar-Apr. – Vol. 21, N 2. – P. 146–160.
4. Fürst, P. Determination of endogenous middle molecules in normal and uremic body fluids / P. Fürst, L. Zimmerman, J. Bergström // Clin. Nephrol. – 1976 Apr. – Vol. 3, N 2. – P. 178–188.
5. The middle molecule hypothesis in perspective / A. L. Babb [et al.] // Am. J. Kidney Dis. – 1981 Jul. – Vol. 1, N 1. – P. 46–50.
6. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability / R. Vanholder [et al.] // Kidney Int. – 2003 May. – Vol. 63, N 5. – P. 1934–1943.
7. Косинец, А. Н. Протеиназы и их ингибиторы в гнойной хирургии и онкологии / А. Н. Косинец, Л. Н. Кирпиченко. – Витебск, 2003. – 409 с.
8. Сикорская, Т. А. Дисбаланс протеиназо-ингибиторной системы и уровень эндотоксикоза у пациентов с микроб-ассоциированным псориазом / Т. А. Сикорская, Г. Н. Бычко, А. М. Лукьянов // Мед. журн. – 2015. – № 1. – С. 116–121.
9. Войтович, Т. Н. Особенности протеиназо-ингибиторной системы у больных муковисцидозом / Т. Н. Войтович, Г. Н. Бычко, А. Г. Чистый // Мед. журн. – 2013. – № 2. – С. 59–62.
10. Малахова, М. Я. Эндогенная интоксикация как отражение компенсаторной перестройки обменных процессов в организме / М. Я. Малахова // Эфферент. терапия. – 2000. – № 4. – С. 3–14.
11. Карякина, Е. В. Молекулы средней массы как интегральный показатель нарушений (обзор литературы) / Е. В. Карякина, С. В. Белова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 3. – С. 3–8.
12. Функционально-системные реакции организма при эндотоксикозе и их коррекция / Н. Д. Бунятян [и др.] // Фармация. – 2011. – № 6. – С. 43–46.
13. Назаренко, Г. И. Лабораторные методы диагностики неотложных состояний / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М.: Медицина, 2002. – 568 с.
14. Ермаков, А. В. Диагностические возможности использования метода определения уровня среднемолекулярных соединений в практической медицине / А. В. Ермаков // Проблемы экспертизы в медицине. – 2005. – Т. 5, № 17-1. – С. 27–29.
15. Применение эфферентных методов терапии при критических состояниях: метод. рек. / В. И. Черный [и др.] – Донецк, 2007. – 15 с.
16. Шепилова, Ж. И. Диагностическое значение определения средних молекул при некоторых деструктивных патологических процессах / Ж. И. Шепилова, С. О. Балякин // Лаб. дело. – 1984. – № 9. – С. 546–548.
17. Габриэлян, Н. И. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях: метод. рек. / Н. И. Габриэлян. – М., 1985. – 17 с.
18. «Средние молекулы» – образования и способы определения / В. В. Николайчик [и др.] // Лаб. дело. – 1989. – № 28. – С. 31–33.
19. Малахова, М. Я. Метод регистрации эндогенной интоксикации: метод. рек. / М. Я. Малахова. – СПб., 1995. – 33 с.
20. Среднемолекулярные пептиды плазмы крови при диабетической нефропатии / Д. В. Василенко [и др.] // Журн. теорет. и практ. медицины. – 2004. – Т. 2, № 3. – С. 203–205.
21. Нагоев, Б. С. Значение определения средних молекул в плазме крови при инфекционных заболеваниях вирусной и бактериальной этиологии / Б. С. Нагоев, М. И. Габрилович // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – № 1. – С. 9–11.
22. Афанасьева, А. Н. Сравнительная оценка уровня эндогенной интоксикации у лиц разных возрастных групп / А. Н. Афанасьева // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 6. – С. 11–13.
23. Способ определения «средних молекул» / В. В. Николайчик [и др.] // Лаб. дело. – 1991. – № 10. – С. 13–18.
24. Анализ пептидов из тканей животных и растений / О. В. Шваб [и др.] // Биоорганическая химия. – 1999. – Т. 25, № 1. – С. 20–24.
25. Yang, P. Practical comparison of LC columns packed with different superficially porous particles for the separation of small molecules and medium size natural products / P. Yang, T. McCabe, M. Pursch // J. Sep. Sci. – 2011 Nov. – Vol. 34, N 21. – P. 2975–2982.
26. Остерман, Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л. А. Остерман. – М.: Наука, 1985. – 536 с.
27. Mass spectrometry of blood low-molecular fraction as a method for unification of therapeutic drug monitoring / P. G. Lokhov [et al.] // Biomed. Khim. – 2014 Mar-Apr. – Vol. 60, N 2. – P. 201–216.
28. Lokhov, P. G. Diagnosis of lung cancer based on direct-infusion electrospray mass spectrometry of blood plasma metabolites / P. G. Lokhov, O. N. Kharybin, A. I. Archakov // Int. J. Mass. Spect. – 2012. – Vol. 309. – P. 200–205.
29. Трифонова, О. П. Метаболомное профилирование крови / О. П. Трифонова, П. Г. Лохов, А. И. Арчаков // Биомед. химия. – 2014. – Т. 60, № 3. – С. 281–294.
30. Toshimitsu, N. Update of uremic toxin research by mass spectrometry / N. Toshimitsu // Mass. Spec. Rev. – 2011. – Vol. 30, N 3. – P. 510–521.
31. Кирковский, В. В. Физико-химические методы коррекции гомеостаза / В. В. Кирковский. – М.: Русский врач,

2012. – 216 с.

32. Лобко, Н. Ф. Новый способ определения тяжести состояния больных туберкулезом легких по уровню тирозин-содержащих пептидов / Н. Ф. Лобко, С. В. Конев // Изв. Нац. академии наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2005. – № 2. – С. 20–22.
33. Флуоресцентные зонды как источник клинически значимой информации / Н. В. Смолина [и др.] // Фундаментальные науки – медицине: биофизические медицинские технологии. – 2015. – Т. 2. – С. 293–327.
34. Glycated albumin: from biochemistry and laboratory medicine to clinical practice / E. Dozio [et al.] // Endocrine. – 2016 Sep. – P. 1–9.
35. Иванова, С. В. Корреляционный анализ флуоресцентных и протеолитических показателей в сыворотке крови и синовиальной жидкости при артритах / С. В. Иванова, Л. Н. Кирпиченко, Е. В. Кундер // Вестн. ВГМУ. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 162–169.
36. Спектральные методы исследования структурно-функционального состояния основных транспортных белков плазмы крови пациентов с дислипидемией / Е. А. Короленко [и др.] // Новости медико-биол. наук. –

2013. – Т. 7, № 1. – С. 18–22.

37. Карягина, И. Ю. Использование метода комплексного определения активности трипсиноподобных протеиназ, α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина в гастроэнтерологической практике / И. Ю. Карягина, Р. А. Зарембский, М. Д. Балябина // Лаб. дело. – 1990. – № 2. – С. 10–13.
38. Ермола, Ю. А. Локальные и системные изменения показателей неспецифических протеиназ и их ингибиторов при экспериментальном перитоните / Ю. А. Ермола, И. И. Фомочкина, А. В. Кубышкин // Украин. мед. альманах. – 2012. – Т. 15, № 5. – С. 80–82.
39. Фомочкина, И. И. Патогенетическое значение протеиназ-ингибиторной системы в развитии локальной и системной патологии / И. И. Фомочкина, А. В. Кубышкин // Патология. – 2012. – № 2. – С. 50–54.
40. Иванова, С. В. Спектрально-флуоресцентный анализ и протеолитическая активность сыворотки крови и синовиальной жидкости при артритах / С. В. Иванова, Л. Н. Кирпиченко, Е. В. Кундер // Журн. ГрГМУ. – 2009. – № 4. – С. 73–77.

Поступила 20.09.2016 г.

Принята в печать 09.12.2016 г.

References

1. Vitkina TI. Average molecules in assessment of level of endogenic intoxication at chronic not obstructive bronchitis. *Zdorov'e Med Ekologii i Nauka*. 2014;(2):70-2. (In Russ.)
2. Galaktionov SG, Tseytin VM, Leonova VI, Nikolaychik VV, Mikhneva LM. The peptides of the group of «middle molecules». *Bioorgan Khimii*. 1984;(10(1):5-17. (In Russ.)
3. Vanholder R, Van Laecke S, Glorieux G. The middle-molecule hypothesis 30 years after: lost and rediscovered in the universe of uremic toxicity? *J Nephrol*. 2008 Mar-Apr;21(2):146-60.
4. Fürst P, Zimmerman L, Bergström J. Determination of endogenous middle molecules in normal and uremic body fluids. *Clin Nephrol*. 1976 Apr;3(2):178-88.
5. Babb AL, Ahmad S, Bergström J, Scribner BH. The middle molecule hypothesis in perspective. *Am J Kidney Dis*. 1981 Jul;1(1):46-50.
6. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P, et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int*. 2003 May;63(5):1934-43.
7. Kosinets AN, Kirpichenok LN. Proteinases and their inhibitors in purulent surgery and an oncology. *Vitebsk, RB*; 2003. 409 p. (In Russ.)
8. Sikorskaya TA, Bychko GN, Lukyanov AM. Imbalance, proteinase-inhibitory system and the level of endotoxemia in patients with microbe-associated psoriasis. *Med Zhurn*. 2015;(1):116-21. (In Russ.)
9. Voytovich TN, Bychko GN, Chistyy AG. Features of proteinase-inhibitory system at patients with a mucoviscidosis. *Med Zhurn*. 2013;(2):59-62. (In Russ.)
10. Malakhova MYa. Endogenic intoxication as reflection of compensatory reorganization of metabolic processes in an organism. *Efferent Terapii*. 2000;(4):3-14. (In Russ.)
11. Karyakina EV, Belova SV. Molecules of average weight as integrated indicator of disturbances (review of literature). *Klin Lab Diagnostika*. 2004;(3):3-8. (In Russ.)
12. Bunyatyan ND, Vlasov AP, Nachkina EI, Kochkarova RR, Shibitov VA, Kargaeva TN, et al. Functional and systemic reactions of an organism at endointoxication and their correction. *Farmatsiia*. 2011;(6):43-6. (In Russ.)
13. Nazarenko GI, Kishkun AA. Laboratory diagnostic methods of medical emergencies. Moscow, RF: Meditsina; 2002. 568 p. (In Russ.)
14. Ermakov AV. Diagnostic possibilities of using the method of determining the level of medium molecular compounds in the practice of medicine. *Problemy Ekspertizy v Meditsine*. 2005;5(17-1):27-9. (In Russ.)
15. Cherniy VI, Novikova RI, Kostenko VS, Shramenko EK, Logvinenko LV. Use of efferent methods of therapy at critical conditions: metod rek. Donetsk, Ukraine; 2007. 15 p. (In Russ.)
16. Shepilova ZhI, Balyakin SO. Diagnostic value of determination of middle molecules in some of the destructive pathological processes. *Lab Delo*. 1984;(9):546-8. (In Russ.)
17. Gabrielyan NI. Screening method for determination of middle molecules in biological fluids: metod rek. Moscow, RF; 1985. 17 c. (In Russ.)
18. Nikolaychik VV, Kirkovskiy VV, Moin VM, Mazur LI, Lobacheva GA, Bychko GN, et al. «Average molecules» – educations and ways of definition. *Lab Delo*. 1989;(28):31-3. (In Russ.)
19. Malakhova MYa. Method of registration of endogenic intoxication: metod rek. Saint-Petersburg, RF; 1995. 33 p. (In Russ.)
20. Vasilenko DV, Alabovskiy VV, Maslov AI, Ostroushko AP. Medium molecular peptides in the blood plasma in diabetic nephropathy. *Zhurn Teoret Prakt Meditsiny*. 2004;2(3):203-05. (In Russ.)
21. Nagoev BS. Value of definition of average molecules in a blood plasma at infectious diseases of a virus and bacterial etiology. *Klin Lab Diagnostika*. 2000;(1):9-11. (In Russ.)
22. Afanasyeva AN. Comparative assessment of level of endogenic intoxication at persons of different age groups. *Klin Lab Diagnostika*. 2004;(6):11-3. (In Russ.)

23. Nikolaychik VV, Moin VM, Kirkovskiy VV, Mazur LI, Lobacheva GA, et al. Way of definition of «average molecules». Lab Delo. 1991;(10):13-8. (In Russ.)
24. Shvab OV, Trishkin SV, Shenel EN, Vaskovekiy BV, Sukhikh GT, Demushkin VP. The analysis of peptides from tissues of animals and plants. Bioorgan Khimiia. 1999;25(1):20-4. (In Russ.)
25. Yang P, McCabe T, Pursch M. Practical comparison of LC columns packed with different superficially porous particles for the separation of small molecules and medium size natural products. J Sep Sci. 2011 Nov;34(21):2975-82. doi: 10.1002/jssc.201100530
26. Osterman L. Chromatography of proteins and nucleic acids. Moscow, RF: Nauka, 1985. 536 p. (In Russ.)
27. Lokhov PG, Maslov DL, Trifonova OP, Balashova EE, Archakov AI. Mass spectrometry of blood low-molecular fraction as a method for unification of therapeutic drug monitoring. Biomed Khim. 2014 Mar-Apr;60(2):201-16.
28. Lokhov PG, Kharybin ON, Archakov AI. Diagnosis of lung cancer based on direct-infusion electrospray mass spectrometry of blood plasma metabolites. Int J Mass Spect. 2012;309:200-5.
29. Trifonova OP, Lokhov PG, Archakov AI. Metabolomny profiling of a blood. Biomed Khimiia. 2014;60(3):281-94. (In Russ.)
30. Toshimitsu N. Update of uremic toxin research by mass spectrometry. Mass Spec Rev. 2011;30(3):510-21. doi: 10.1002/mas.20323
31. Kirkovskiy VV. Physical and chemical methods of correction of a homeostasis. Moscow, RF: Russkii vrach; 2012. 216 p. (In Russ.)
32. Lobko NF, Konev SV. A new method for determining the severity status of patients with pulmonary tuberculosis according to the level of tyrosine-containing peptides. Izv Nats Akademii Nauk Belarusi Ser Med Nauk. 2005;(2):20-2. (In Russ.)
33. Smolina NV, Syreyschikova TI, Uzbekov MG, Dobretsov GE. V: Fluorescent probes as a source of clinically relevant information. Fundamental'nye nauki – meditsine: biofizicheskie meditsinskie tekhnologii. 2015;2:293-327. (In Russ.)
34. Dozio E, Di Gaetano N, Findeisen P, Corsi Romanelli MM. Glycated albumin: from biochemistry and laboratory medicine to clinical practice. Endocrine. 2016 Sep. doi: 10.1007/s12020-016-1091-6
35. Ivanova SV, Kirpichenok LN, Kunder EV. Correlation analysis of fluorescence and proteolytic indices in the serum and synovial fluid in arthritis. Vestn VGMU. 2010;9(3):162-9. (In Russ.)
36. Korolenko EA, Korolik EV, Dikevich AE, Korolik AK, Kirkovskiy VV. Spectral methods of investigation of structural-functional state of the main transport protein of blood plasma of patients with dyslipidemia. Novosti Mediko-Biol Nauk. 2013;7(1):18-22. (In Russ.)
37. Karyagina IYu, Zarembskiy RA, Balyabina MD. Using the method of complex determination of the activity of trypsin-like proteases, α_1 -antitrypsin and α_2 -macroglobulin in gastroenterological practice. Lab Delo. 1990;(2):10-3. (In Russ.)
38. Ermola YuA, Fomochkina II, Kubyshevskiy AV. Local and systemic changes of indicators of nonspecific proteinases and their inhibitors at experimental peritonitis. Ukraïn Med Al'manakh. 2012;15(5):80-2. (In Russ.)
39. Fomochkina II, Kubyshevskiy AV. Pathogenetic value of proteinases – inhibitory system in development of local and systemic pathology. Patologiya. 2012;(2):50-4. (In Russ.)
40. Ivanova SV, Kirpichenok LN, Kunder EV. Spectral-fluorescence and proteolytic activity of blood serum and synovial fluid in arthritis. Zhurn GrGMU. 2009;(4):73-7. (In Russ.)

Submitted 20.09.2016

Accepted 09.12.2016

Сведения об авторах:

Бурдашкина К.Г. – аспирант кафедры биоорганической химии, Белорусский государственный медицинский университет;

Бычко Г.Н. – к.б.н., ведущий научный сотрудник научно-исследовательской части, Белорусский государственный медицинский университет;

Кирковский В.В. – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник научно-исследовательской части, Белорусский государственный медицинский университет;

Ринейская О.Н. – к.м.н., доцент, заведующая кафедрой биоорганической химии, Белорусский государственный медицинский университет.

Information about authors:

Burdashkina K.G. – postgraduate of the Chair of Bioorganic Chemistry, Belarusian State Medical University;

Bychko G.N. – Candidate of Biological Sciences, leading research officer of the Scientific-Research Department, Belarusian State Medical University;

Kirkovsky V.V. – Doctor of Medical Sciences, professor, principal research officer of the Scientific- Research Department, Belarusian State Medical University;

Rineyskaya O.N. – Candidate of Medical Sciences, associate professor, head of the Chair of Bioorganic Chemistry, Belarusian State Medical University.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, Белорусский государственный медицинский университет, кафедра биоорганической химии. E-mail: burdashkina.kg@gmail.com – Бурдашкина Кристина Григорьевна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210116, Minsk, 83 Dzerzhinsky ave., Belarusian State Medical University, Chair of Bioorganic Chemistry. E-mail: burdashkina.kg@gmail.com – Burdashkina Kristina G.