

МЕТОДИКА

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616.613-003.7

Верлов Н.А.¹, Ланда С.Б.¹, Егоров В.В.¹, Эмануэль Ю.В.², Эмануэль В.Л.²

Уромодулин: связь олигомерных форм и функции

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1;

²ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, Санкт-Петербург, Россия, ул. Льва Толстого, д. 6-8

Введение. Уромодулин является основным белком присутствующим в моче в норме, его физиологическая роль очень разнообразна. Оценка его вклада в стабилизацию коллоида мочи в норме и при различных патологических состояниях требует детального исследования олигомерных форм, присутствующих в моче, их структуры и функций. **Цель работы** – изучение структурных особенностей олигомерных форм белка уромодулина в моче здоровых добровольцев и пациентов с подтвержденным уролитиазом и выявление связи структуры белка и его роли в стабилизации коллоида мочи.

Методика. Методом динамического рассеяния света, анализом треков наночастиц и измерением дзета-потенциала изучены биофизические свойства изоформ уромодулина (UM), присутствующего в нативной моче в виде олигомерных форм, из которых можно выделить 2 основные: UM(7) – глобулярная молекула массой 7MDa, характеризуется гидродинамическим радиусом $R_h=90-100$ нм и отрицательным поверхностным зарядом величиной $25 - 30$ мВ; UM(28) – массой 28MDa обладает палочкоподобной структурой с гидродинамическим радиусом $R_h=200-300$ нм и существенно меньшим по величине поверхностным зарядом $0 - -7$ мВ.

Результаты. В норме в моче UM(7) является доминантной формой, при этом вклад UM(28) либо отсутствует, либо незначителен. При уролитиазе доля UM(7) радикально уменьшается и вклад UM(28) становится основным. В модельных экспериментах показаны различия этих переходов в моче здоровых лиц и пациентов с уролитиазом в зависимости от величины pH и концентрации одновалентных катионов: натрия, калия и аммония.

Заключение. На основании полученных данных существенно расширено представление о саногенетической системе коллоидного гомеостаза мочеобразования и патогенезе кристаллогенеза. Аппроксимация выдвинутой концепции развития патологического кристаллогенеза в клиническую практику расширяют информативность превентивной диагностики уролитиаза.

Ключевые слова: Уромодулин; белок Тамма-Хорсфалла; динамическое рассеяние света; анализ треков наночастиц; дзета-потенциал; титрование; уролитиаз

Для цитирования: Верлов Н.А., Ланда С.Б., Егоров В.В., Эмануэль Ю.В., Эмануэль В.Л. Уромодулин: связь олигомерных форм и функции. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 133-140.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.133-140

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Эмануэль В.Л., Верлов Н.А., Ланда С.Б.; сбор и обработка материала – Верлов Н.А., Ланда С.Б., Егоров В.В.; подготовка иллюстративного материала – Верлов Н.А., Ланда С.Б., Егоров В.В.; статистическая обработка – Эмануэль Ю.В.; написание текста – Эмануэль В.Л., Верлов Н.А., Ланда С.Б., Егоров В.В.; редактирование – Эмануэль В.Л., Верлов Н.А., Эмануэль Ю.В.

Для корреспонденции: Эмануэль Владимир Леонидович, e-mail: vladimirem1@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.06.2020

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Verlov N.A.¹, Landa S.B.¹, Egorov V.V.¹, Emanuel Yu.V.², Emanuel V.L.²

Uromodulin: Relationship of protein oligomeric forms and functions

¹B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute of the National Research Centre «Kurchatov Institute», Orlova Roshcha Microdistrict 1, Leningradskaya Oblast, Gatchina 188300, Russian Federation;

²I.P. Pavlov Saint Petersburg First State Medical University,

L'va Tolstogo Str. 6-8, Saint Petersburg 197022, Russia

Introduction. Uromodulin is the major protein, which is normally present in urine and plays multiple physiological roles. Evaluation of the uromodulin contribution to stabilization of urinary colloids in normal and various pathological conditions requires a comprehensive study of uromodulin oligomeric forms occurring in urine, their structure and functions.

The aim of this work was studying structural features of uromodulin oligomeric forms in the urine of healthy volunteers and patients with confirmed urolithiasis and identifying a relationship between the protein structure and role in stabilization of urinary colloids.

Methods. Dynamic light scattering (DLS), nanoparticle tracking analysis (NTA), and measurement of zeta potential were used to study biophysical properties of uromodulin (UM) isoforms. UM is present in native urine as oligomeric forms, including two major ones: i) UM (7), a 7MDa globular molecule characterized by a hydrodynamic radius $R_h = 90-100$ nm and a negative surface charge of 25–30 mV and ii) UM (28), a rod-like 28MDa molecule with a hydrodynamic radius of $R_h = 200-300$ nm and a significantly lower surface charge of 0 –7 mV.

Results. Normally, UM (7) is a dominant form in urine whereas the UM (28) contribution is either non-existent or minor. In urolithiasis, the proportion of UM (7) decreases drastically, and the contribution of UM (28) becomes primary. Model experiments showed differences between these transitions in the urine of healthy individuals and patients with urolithiasis depending on pH values and concentrations of monovalent cations, including sodium, potassium, and ammonium.

Conclusion. The study results considerably expanded the concept of the sanogenetic system of colloidal homeostasis in urine formation and the pathogenesis of crystallogenesis. Approximating the proposed concept of pathological crystallogenesis in clinical practice expands the informative value of preventive diagnosis of urolithiasis.

Keywords: uromodulin, Tamm-Horsfall protein, dynamic light scattering, nanoparticle tracking analysis, zeta potential, titration, urolithiasis

For citation: Verlov N.A., Landa S.B., Egorov V.V., Emanuel Yu.V., Emanuel V.L. Uromodulin: the relationship of protein oligomeric forms and functions. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 133-140. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.133-140

Contribution: research concept and design – Emanuel V.L., Verlov N.A., Landa S.B.; collection and processing of material – Verlov N.A., Landa S.B., Egorov V.V.; preparation of illustrative material – Verlov N.A., Landa S.B., Egorov V.V.; statistical processing – Emanuel Yu.V.; text writing – Emanuel V.L., Verlov N.A., Landa S.B., Egorov V.V.; editing – Emanuel V.L., Verlov N.A., Emanuel Yu.V.

For correspondence: Emanuel V.L., Doctor of Medical Sciences, Professor, head Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a course of molecular medicine, Director of the Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine of the Ministry of Health of the Russian Federation basis on Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, e-mail: vladimirem1@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Information about the authors:

Verlov N.A., <https://orcid.org/0000-0002-3756-0701>

Landa S.B., <https://orcid.org/0000-0001-5546-250X>

Egorov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-3670-8962>

Emanuel V.L., <https://orcid.org/0000-0002-2079-0439>

Received 13.06.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

Уромодулин, ранее позиционируемый как «белок Тамма-Хорсфалла» (UM), представляет собой гликопротеин открытый I. Tamm и F.L. Horsfall в 1950 г. [1]. UM – специфичный почечный белок массой 95 кDa, кодируемый геном UMOD, расположенным в хромосоме 16p12.3 [2], является мажорным белком, выделяемым с мочой в объеме от 20 до 100 мг в норме [3]. Уникальный «протеом мочеобразования» синтезируется исключительно в эпителиальных клетках, выстилающих дистальные каналцы толстого сегмента восходящего колена петли Генле (TAL). Предполагается, что UM играет существенную роль в ре-

гуляции водно-электролитного баланса и широкого диапазона физико-химических условий мочеобразования [8, 9]. Формирование посттрансляционных изоформ белка проявляется способностью к патологическому гелеобразованию [10], снижению местного иммунитета и, следовательно, к развитию инфекции мочевыводящих путей [11, 12]. Нарушения апикальной мембраны почечного канальца с развитием уромодулинемии индуцирует интерстициальное воспаление, приводящее к прогрессирующему фиброзу, следовательно развитию хронической болезни почек [13].

Методика

В работе использован биоматериал (моча) пациентов, наблюдавшихся в урологическом отделении клиники ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова (Санкт-Петербург). Были получены информированные согласия пациента и одобрение локального этического комитета. Верификация диагноза проводилась на основании комплекса клинических признаков и данных инструментального обследования. Критерием включения являлась верификация методом ИК-спектроскопией (Фурье-спектрометр ALPHA, «Bruker Optik GmbH», Германия) преимущественно оксалатных конкрементов, отделяемых и/или удаленных при хирургическом пособии или дистанционной литотрипсии. Гендерное распределение в группе больных составило: мужчин – 45 (45%), женщин – 55 (55%). Средний возраст больных составил $46,5 \pm 1,8$ лет, возраст при возникновении заболевания – $39,9 \pm 1,4$ лет, продолжительность заболевания – $6,6 \pm 3,9$ лет. Контрольная группа была сформирована из 40 практически здоровых добровольцев: 22 женщины в возрасте от 19 до 47 лет и 18 мужчин в возрасте от 18 до 44 лет.

Выделение ТНР из мочи. Для выделения УМ из биологического материала использован метод высаливания 0.6M NaCl [1]. Качество очистки контролировали методом денатурирующего электрофореза в ПААГ.

Метод динамического рассеяния света. Метод динамического рассеяния света (DLS) основан на взаимодействии монохроматического когерентного излучения со светорассеивающими частицами исследуемой жидкости. Информация о всех динамических процессах в изучаемой системе содержится в спектре флуктуаций света, рассеянного на частицах в растворе. Использована гетерогенная схема, при которой на фотоприемнике совмещаются фронты 2 лучей (рассеянного и опорного). В качестве опорного пучка использовалось лазерное излучение под углом 90° , которым облучается исследуемая система [14, 15]. Результат измерений представляется в виде гистограммы распределения частиц по размерам, в которой ось абсцисс – шкала размеров в нанометрах, ось ординат – вклад в общее рассеяние образца частиц данного размера в процентах. При этом суммарное рассеяние всех частиц образца принимается за 100%. Для каждого образца измерения проводили не менее 5 раз; данные, полученные в результате регуляризации, усредняли.

Метод анализа траекторий наночастиц (NTA). Метод анализа траекторий наночастиц (NTA; NanoSight® LM10, Malvern Instruments, Великобритания: синий ла-

зер (45 мВт при 488 нм) и камера C11440-5B (Hamamatsu photonics К. К., Япония) использован для измерения гидродинамического диаметра и концентрации частиц УМ. Суспензию, приготовленную посредством разведения исходного образца в PBS, пропускали через проточную кювету NanoSight®. Для записи и анализа полученных результатов использовалось программное обеспечение NTA 2.3. При анализе записей длительностью 30-60 с оценивались следующие параметры: средний гидродинамический диаметр, мода распределения, стандартное отклонение и концентрация суспензии.

Титрование рН и концентрации одновалентных ионов. Для выяснения влияния рН и концентрации одновалентных катионов на олигомерные формы УМ готовили универсальный буфер из смеси уксусной фосфорной и борной кислот в эквимолярном соотношении по 40 мМ каждая [16]. До нужного рН смесь доводится 200 мМ NaOH . В выбранном диапазоне рН ионная сила (IF) буферного раствора колебалась от 123 мМ для рН -2.56 до 136 мМ для рН -9.91 . Для получения необходимой ионной силы раствор буфера либо разбавляли дистиллированной водой, до нужной концентрации, либо доводили до нужной концентрации 1М или 3М раствором NaCl. Аликвоты белка, выделенного и очищенного как описано выше, разбавлялись буфером в соотношении 1:1000 и помещались в кювету лазерного корреляционного спектрометра «ЛКС-03» (Сертификат Госстандарта Ru.C39.022A № 17157) для измерения размеров частиц. Измерения проводили в полосе 2048 Гц. По результатам измерений вычисляли среднее значение, дисперсию и стандартное отклонение размера частиц и их вклада в рассеяние для каждого пика гистограммы распределения частиц по размерам. Для формы УМ(7) ($R_h = 100\text{ нм}$) строили кривые зависимости вклада в рассеяние от рН раствора для каждой ионной силы отдельно. Были получены семейства таких кривых для нормального УМ, УМ больных МКБ очищенного с помощью диализа, и УМ который не удалось очистить диализом.

Для выяснения различий в действии одновалентных катионов буферные растворы готовили также, только NaOH заменяли на KOH или водный раствор аммиака, а NaCl на KCl или NH_4Cl . После этого к растворам добавляли водный раствор УМ в соотношении 1:1000.

Метод атомно-силовой микроскопии. Для атомно-силовой микроскопии использовали сканирующий зондовый микроскоп Solver-Bio (NT-MDT, Россия). Раствор образца в концентрации 1 мг/мл наносили на поверхность слюды (сразу после расщепления, freshly-cleaved mica) инкубировали в течение 60 с и отмывали

три раза 50 мкл деионизованной воды при помощи сэмплера. Высушивали образец при помощи сжатого воздуха, затем проводили сканирование образца в полуконтактном режиме с использованием зонда NSG03 (NT-MDT, Россия). Для обработки изображений использовали программу NT-MDT Image Analysis.

Результаты и обсуждение

В настоящее время принято считать, что форма UM(7) характерна для нормы, в то время как UM(28) характерна для пациентов с уролитиазом¹. Различия во фракционном составе олигомерных форм UM подтверждаются диффузометрическими методами, динамическим рассеянием света (рис. 1) и NTA (рис. 2). Для образцов мочи полученных от здоровых добровольцев характерен пик в области 90-100 нм ($R_h = 100$ нм), характерный для олигомерной формы UM(7). Для образцов, полученных от пациентов с МКБ, характерен пик в области 200 нм и более, данный пик соответствует UM(28), при этом происходит сдвиг первого пика в область меньших размеров (60-70 нм).

Данные, полученные методом NTA, частично подтверждают результаты корреляционной спектроскопии (рис. 2). В образцах от здоровых добровольцев, медиана распределения составляет 126 ± 6 нм, мода – 112 ± 5 нм. Существенные отличия наблюдаются при МКБ: распределение имеет более пологий вид, медиана составляет 296 ± 28 нм, мода – 260 ± 23 нм, т.е. характерен пик с размером, соответствующим UM(28).

Данные о различиях форм UM(7) и UM(28) получены на основании данных атомносиловой микроскопии (рис. 3). Для UM(7) характерна глобулярная структура представляющая из себя стохастический клубок, а UM(28) представляет собой палочкоподобную структуру с большим соотношением длины к толщине (>40). Результаты микроскопии подтверждают данные, полученные диффузометрическими методами, относительно размеров олигомерных форм.

Зависимость соотношения олигомерных форм UM от физико-химических свойств раствора. Тот факт, что форма UM(28) образуется в растворах с высокой ионной силой отмечался еще в работах Максфилда [17]. Нами впервые изучена динамика перехода формы UM(7) в UM(28) при изменении ионной силы окружающего раствора и pH. На рис. 4 представлена динамика содержания UM(7) по величине убыли вклада в светорассеяние этой формы, имеющий характерный R_h порядка 100 нм [18]. Аликвоты образцов были помещены в раствор NaCl различных концентраций: 0

М, 005 М, 015 М, 0.25 М, 0.35 М, 0.45 М и 0.6 М при pH 7. Последняя концентрация гарантировано приводит к массовому образованию тетрамерной формы UM(28), так как именно данная концентрация NaCl используется для выделения UM из мочи. На рис. 5 представлена зависимость уменьшения вклада олигомерной формы UM(7) в светорассеяние от концентрации натрия, калия и аммония в растворе при pH = 6, содержащем образцы UM из мочи здорового человека (А) и больных МКБ, у которых удалось отделить UM от кристаллов солей – UM(28)F (Б) и у которых БТХ

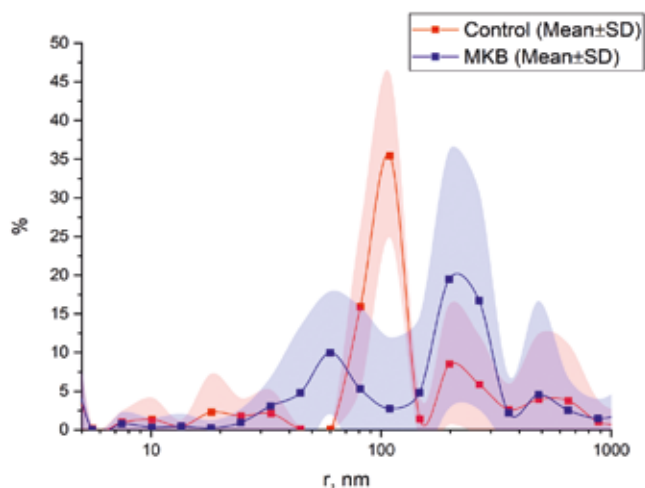


Рис. 1. Распределение размеров частиц в моче в норме и при патологии (метод динамического рассеяния света). Красная кривая – образцы, полученные от здоровых добровольцев (среднее±СКО). Синяя кривая – образцы, полученные от пациентов с МКБ (среднее±СКО).

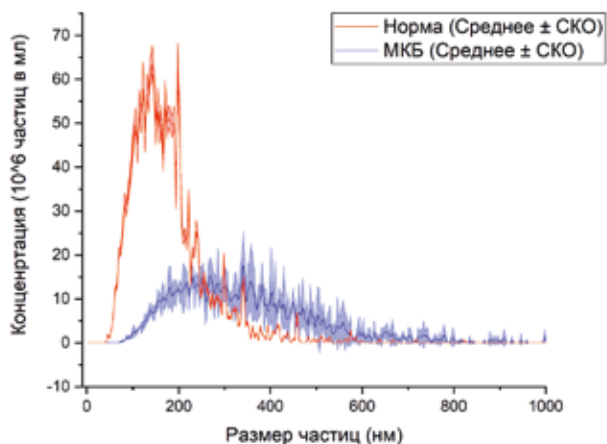


Рис. 2. Распределение размеров частиц в моче в норме и при патологии (анализ треков наночастиц). Красная кривая – образцы, полученные от здоровых добровольцев (среднее±СКО). Синяя кривая – образцы, полученные от пациентов с МКБ (среднее±СКО).



Рис. 3. Атомно-силовое изображение глобулярной структуры UM(7) (слева) и палочкоподобной структуры UM(28) (справа).

так и остался связанным с кристаллами солей UM(28) А (В). Следует отметить, что половые различия в олигомеризации UM отсутствуют, поэтому данные для мужчин и женщин отдельно не приводятся.

Исходное количество олигомерной формы UM(7) у здоровых людей всегда близко к 100 % (рис. 5, а). Кривая имеет вид типичной «пороговой кривой» с точкой перегиба при концентрации 250 мМ для натрия и аммония и 150 мМ для калия. До этой концентрации образование формы UM(28) идет медленно, а при достижении порога концентрации резко ускоряется. Уровень в 10% достигается при концентрации равной 580 мМ для натрия, 545 мМ для аммония и 450 мМ для калия. Для натрия точка

перегиба близка к физиологическому верхнему референтному интервалу концентрации этого катиона в моче (220 мМ). Для калия точка перегиба наступает при 150 мМ и еще больший запас имеется по аммонiu.

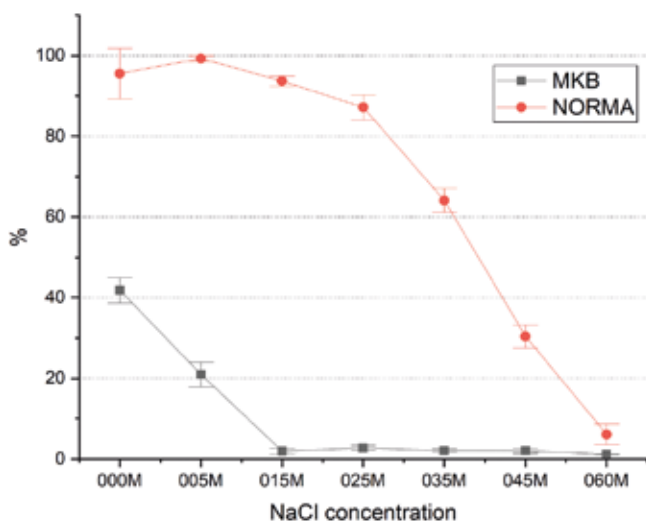


Рис. 4. Динамика содержания UM(7) при различных концентрациях NaCl в норме (красная, а) и при МКБ (черная, б). Среднее ± СКО.

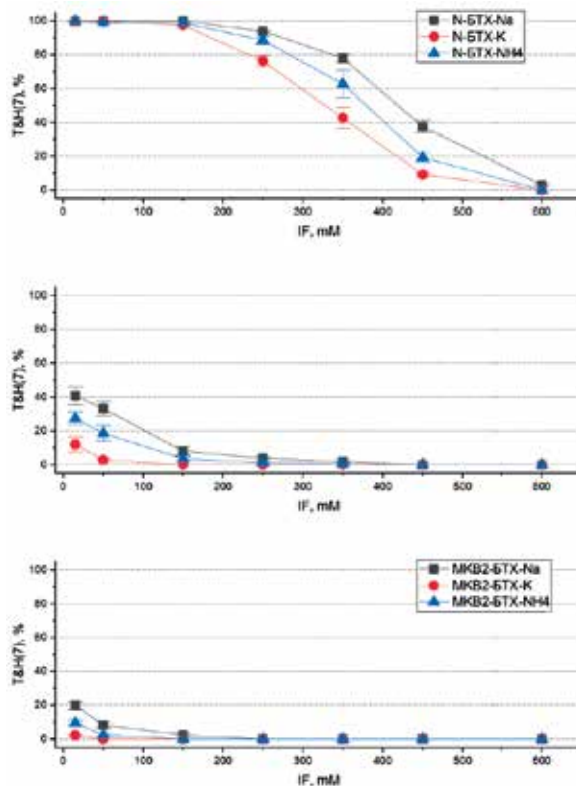


Рис. 5. Титрование растворов белка (ионная сила, IF) в норме и при патологии. а – UM в норме; б – UM при МКБ1; в – UM при МКБ2.

У больных МКБ, т.е. при преобладании формы UM(28)F (рис. 5, б) сказать что-нибудь о пороге образования формы UM(28) невозможно, так как уже при 15 мМ концентрации натрия в образце остается менее 50 % формы UM(7). 10ти % уровень формы UM(7) достигается при концентрации соли 140 мМ для натрия и 105 мМ для аммония. В среде калия количество формы UM(7) не превышает 12% даже при 15 мМ. В тоже время наклон обеих кривых в «беспороговой» части одинаков.

Еще сильнее эта тенденция выражена в группе МКБ2, т.е. при преобладании формы UM(28)А (рис. 5, в). В натриевой среде 10ти% уровень формы UM(7) наблюдается при 40 мМ, в среде аммония при 15 мМ, а в среде калия даже при 15 мМ вклад формы UM(7) составляет не более 2%.

Переход из формы UM(7) в форму UM(28) происходит и при увеличении кислотности раствора (рис. 6). Для нормального UM кривые зависимости количества формы UM(7) от pH также как и в случае с одновалентными катионами носят ярко выраженный пороговый характер. Особенно ярко это проявляется, когда концентрация соли в растворе не превышает физиологического диапазона (250 мМ Na). В этом случае резкое уменьшение содер-

жания формы UM(7) происходит при pH менее 4, то есть вблизи изоэлектрической точки нормального UM. 10ти% предел достигается при pH 3.5 – 4.0. При увеличении концентрации соли выше физиологического предела точка перегиба смещается сначала в область pH = 6, а затем и в область щелочных pH: при концентрации Na 450 мМ точка перегиба находится при pH = 8, а при 600 мМ NaCl кривая становится беспороговой. При этом, 10-процентный предел при концентрации соли 450 мМ достигается при pH = 4.5, а при 600 мМ NaCl при pH = 7.

При преобладании формы UM(28)F (рис. 6, б) кривая становится беспороговой уже при концентрации NaCl равной 150 мМ. При более низкой концентрации соли порог наблюдается в диапазоне pH 8.0 – 8.7. 10ти% предел при этих концентрациях соли достигается при pH близкой к 5. При концентрации соли 150 мМ 10-процентный предел наблюдается при pH = 6.2, а вблизи физиологического предела при pH близким к 7. При дальнейшем увеличении концентрации соли 10-процентный предел достигается при все более щелочных pH. При концентрации NaCl 450 мМ 10-процентный предел достигается при pH = 8.7, а при 600 мМ NaCl – при pH 10.

При преобладании формы UM(28)А (рис. 6, в) пороговая кривая наблюдается только при концентрации соли 15 мМ. При этом точка перегиба находится при pH = 9.5, а 10-процентный предел достигается при pH = 6.5. Уже при концентрации соли 50 мМ кривая становится беспороговой, 10-процентный предел при этом достигается при pH 7.1. При концентрации соли вблизи физиологического предела – 250 мМ 10-процентный предел достигается при pH 9.4.

Для исследования превращения олигомерной формы UM(7) в форму UM(28) в норме и при патологии, в т.ч. в широком диапазоне физико-химических свойств мочи, применяли измерения в буферных растворах с различной ионной силой (IF) и pH.

Роль олигомерных форм уромулина в стабилизации мочи. При измерении дзета-потенциала UM исходный раствор белка титровался до требуемой для измерения концентрации натрий фосфатным буфером (PBS). При измерении pH образца составлял 7.4, т.е. на 2 и более порядка превосходит по концентрации ионов водорода величину изоэлектрической точки десиалированной формы UM ($I_p=4-5$) и на 3 порядка и более величину изоэлектрической точки сиалированной формы UM ($I_p=3.2-4.3$) [19]. При измерении образцов, полученных от здоровых добровольцев, наблюдался один пик в области -25 – -30 мВ (рис. 7). В сравнении с данными по распределению размеров, полученных методом корреляционной спектроскопии (рис. 1), можно сделать вывод, что данный пик соответствует олигомерной форме

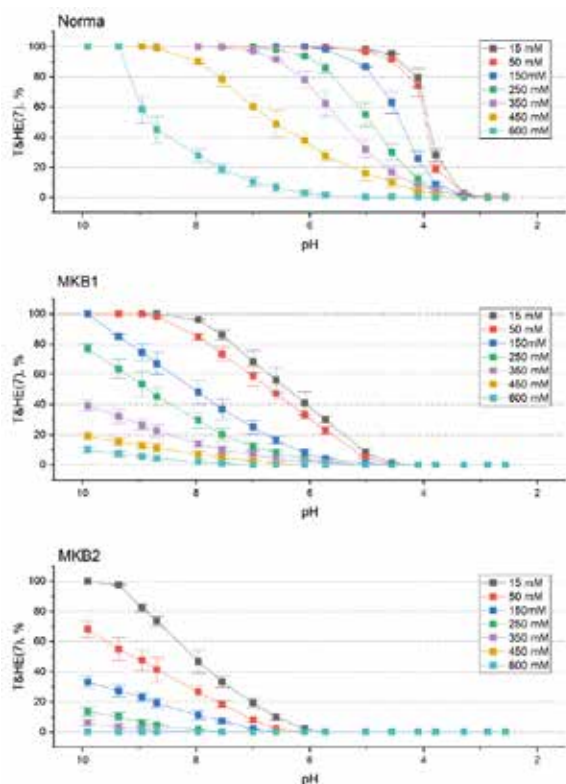


Рис. 6. Титрование растворов белка (pH) в норме и при патологии. а – UM в норме; б – UM при МКБ; в – UM при МКБ2.

UM(7). Полученные результаты хорошо согласуются с концепцией, в соответствии с которой UM(7) – глобулярная олигомерная форма с большим отрицательным зарядом на поверхности молекулы, что обуславливает её вклад в стабилизацию коллоида мочи. При измерении образцов, полученных от пациентов с МКБ, наблюдалось двухмодовое распределение с пиком в области -25 – -35 мВ и вторым пиком в области 0 – 7 мВ (рис. 7). В сравнении с данными о распределении размеров можно сделать вывод о том, что более электроотрицательный пик соответствует форме UM(7), в то время как менее электроотрицательный пик можно отнести к UM(28).

Глобулярная структура UM(7) за счёт достаточной величины поверхностного заряда позволяет стабилизировать биофизические свойства концентрированной мочи. Преимущественный механизм стабилизации коллоида – связывание органических и неорганических ионов вблизи отрицательно заряженных глобул белка. Как было показано ранее при увеличении концентрации NaCl свыше 0.6 М наблюдается агрегация UM(7) и образование формы UM(28). UM(28), в отличие от формы UM(7), имеет не глобулярную, а палочкоподобную структуру (рис. 3). За счёт частичного десиалирования, экранирования поверхностного заряда, а также изменённого форм-фактора UM(28) обладает существенно меньшим, чем UM(7) поверхностным зарядом. Ввиду меньшего поверхностного заряда роль олигомерной формы UM(28) в стабилизации насыщенного раствора за счёт собственной электроотрицательности незначительна. Однако, за счёт существенно большего гидродинамического радиуса, обусловленного не только увеличением массы, но и изменившимся форм-фактором, UM(28) увеличивает характеристическую вязкость раствора, замедляя рост уже сформировавшихся микрокристаллов и формирование из них крупных и трудно выводимых конкрементов. Можно предположить, что ингибирование роста уже образовавшихся микрокристаллов позволяет избежать патологических проявлений и манифестации МКБ, за счёт удаления конкрементов малого размера в процессе мочевыведения.

Таким образом, на основании полученных данных можно утверждать, что в нативной моче в норме наблюдается разнообразие олигомерных форм UM, однако преимущественно представлена фракция UM(7), для пациентов с МКБ увеличивается вклад UM(28). UM(7) и UM(28) отличаются по гидродинамическому радиусу, форм фактору и поверхностному заряду, как следствие, механизм стабилизации коллоида мочи для каждой из олигомерных форм различен. Как в норме, так и при патологии соотношение UM(7) и UM(28) зависит от свойств раствора, таких как концентрация од-

новалентных ионов и рН. С увеличением ионной силы и при понижении рН происходит переход из UM(7) в UM(28). Для пациентов с МКБ характерен большой исходный вклад UM(28) и более выраженная динамика увеличения этого вклада при увеличении IF и рН.

Заключение

Распространенное мнение о том, что форма UM(28) не характерна для нормы, а присутствует исключительно в моче пациентов с МКБ, вряд ли, соответствует реальности. В норме, в ряде случаев могут возникнуть условия (например, высокая концентрация солей, обезвоживание) при которых в моче можно наблюдать UM(28) у здоровых людей. Трансформация олигомерных форм из 7 в 28 МДа, их соотношение в моче отражают функциональную адаптацию процесса мочеобразования физико-химическому составу мочи в конкретный момент времени. Поэтому у здоровых лиц в условиях высокой концентрации солей в моче при выраженной дегидратации, например, можно наблюдать UM(28), верифицируемую в «общем анализе мочи» как гиалиновые цилиндры. Снижение емкости коллоидной системы мочеобразования инициирует первичный кристалогенез в моче, т.е. формирование центра кристаллизации. Состав почечных конкрементов, формируемых на базе этого центра кристаллизации, определяется физико-химическим составом мочи, уровнем компонентов, обуславливающих их пересыщенную концентрацию. Уникальность UM заключается в том, что в широком диапазоне концентраций солей в моче наблюдаются 2 принципиально различных механизма стабилизации коллоида. В области низких концентраций одновалентных катионов стабильность коллоида обеспечивается за счёт выражен-

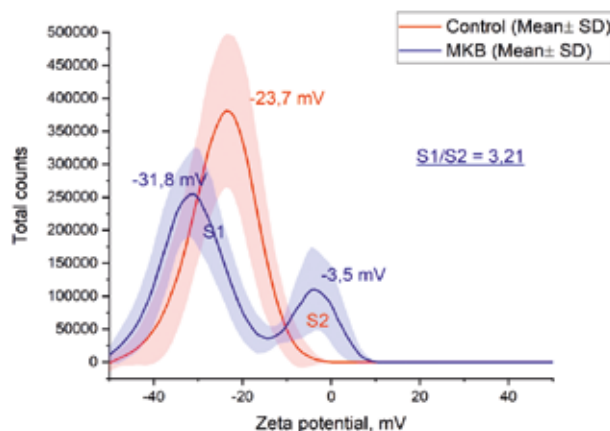


Рис. 7. Зета-потенциал UM в норме и при патологии (соотношение заряда олигомерных форм UM(7) и UM(28)).

ных электроотрицательных свойств олигомерной формы УМ(7). При больших значениях величины ионной силы, когда электроотрицательная форма УМ не способна полностью ингибировать образование центров первичной кристаллизации в коллоиде мочи, активируется иной механизм, при котором УМ(28) частично ингибирует рост образовавшихся микрокристаллов за счёт увеличения вязкости коллоида. Вклад УМ(28) в вязкость коллоида мочи можно оценить по величине характеристической вязкости $[\eta]$. В рассматриваемом случае вязкость определяется не столько общей длиной цепи, зависящей от молекулярной массы олигомера, сколько эффективной длиной цепи в растворе. Только в случае предельно вытянутой цепи ее длина и молекулярный вес пропорциональны друг другу. Определение характеристической вязкости рассчитывается по формуле: $[\eta] = K \times M^\alpha$, где K – коэффициент, постоянный для растворов данного полимергомологического ряда в одном и том же растворителе, α – величина, характеризующая форм-фактор макромолекулы в растворе, зависящей от гибкости цепей и изменяется от 0,5 до 2. Следовательно, прирост характеристической вязкости коллоида мочи при образовании тетраполимера УМ(28) приводит к увеличению молекулярной массы в 4 раза, а изменение коэффициента α с 1 на 2 (1 для глобулярной формы УМ(7), 2 для палочкоподобной формы УМ(28)), увеличивает вязкость в 16 раз. Такой расчёт косвенно подтверждает физиологическое значение наблюдаемых превращений олигомерных форм УМ (7МДа–28МДа) в растворах с высокой концентрацией солей.

Литература

(п.п. 1-14; 17-19 см. References)

15. Ланда С.Б., Филатов М.В., Арутюнян А.В., Варфоломеева Е.В. Исследование образования мегамолекулярных комплексов в плазме крови методом лазерной корреляционной спектроскопии. *Клин. лаб. диагн.* 2008; (4): 37–41.
16. Лурье Ю.Ю. *Справочник по аналитической химии*. М.: Химия; 1989.

References

1. Tamm I., Horsfall F.L. A mucoprotein derived from human urine which reacts with influenza, mumps, and Newcastle disease viruses. *J. Exp. Med.* 1952; 95(1): 71–97.

Сведения об авторах:

Верлов Николай Александрович, канд. биол. наук, зав. Ресурсным центром ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, e-mail: verlov_na@npri.nrcki.ru;

Ланда Сергей Борисович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ;

Егоров Владимир Валерьевич, доктор. биол. наук, ст. науч. сотр. ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ;

Эмануэль Юлия Владимировна, канд. мед. наук, науч. сотр. каф. клинической лабораторной диагностики ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова;

Эмануэль Владимир Леонидович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. клинической лабораторной диагностики ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

2. Rindler M.J., et al. Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein/ uromucoid) is a phosphatidylinositol-linked membrane protein. *J. Biol. Chem.* 1990; 265(34): 20784–9.
3. Nagaraj N., Mann M. Quantitative analysis of the intra- and inter-individual variability of the normal urinary proteome. *J. Proteome Res.* 2011; 10(2): 637–45.
4. Devuyt O., Dahan K., Pirson Y. Tamm-Horsfall protein or uromodulin: new ideas about an old molecule. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005; 20(7): 1290–4.
5. Serafini-Cessi F., Malagolini N., Cavallone D. Tamm-Horsfall glycoprotein: biology and clinical relevance. *Am. J. Kidney Dis.* 2003; 42(4): 658–76.
6. Pruijm M. et al. Associations of Urinary Uromodulin with Clinical Characteristics and Markers of Tubular Function in the General Population. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2016; 11(1): 70–80.
7. Leihner A., et al. Serum uromodulin is associated with impaired glucose metabolism. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96 (5): e5798.
8. Wiggins R.C. Uromucoid (Tamm-Horsfall glycoprotein) forms different polymeric arrangements on a filter surface under different physicochemical conditions. *Clin. Chim. Acta.* 1987; 162(3): 329–40.
9. Renigunta A., et al. Tamm-Horsfall glycoprotein interacts with renal outer medullary potassium channel ROMK2 and regulates its function. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(3): 2224–35.
10. Yoshimura K., et al. Investigation of the Possible Role of Sialic Acid in Calcium Oxalate Urolithiasis. *Eur. Urol.* 1998; 33(1): 111–5.
11. Patras K.A., et al. Tamm-Horsfall glycoprotein engages human Siglec-9 to modulate neutrophil activation in the urinary tract. *Immunol. Cell Biol.* 2017; 95(10): 960–5.
12. El-Achkar T.M., et al. Tamm-Horsfall protein protects the kidney from ischemic injury by decreasing inflammation and altering TLR4 expression. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2008; 295(2): 534–44.
13. Garimella P.S., et al. Urinary uromodulin, kidney function, and cardiovascular disease in elderly adults. *Kidney Int.* 2015; 88(5): 1126–34.
14. Lebedev A.D., et al. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostics. *Appl. Opt.* 1997; 36(30): 7518–22.
15. Landa S.B., et al. Study of plasma megamolecular complexation by laser correlation spectroscopy. *Klin. Lab. Diagn.* 2008; (4): 37–41.
16. Lur'e Yu.Yu. *Handbook of analytical chemistry. [Spravochnik po analiticheskoy khimii]*. Moscow: Khimiya; 1989. (in Russian)
17. Maxfield M. Fractionation of the urinary mucoprotein of Tamm and Horsfall. *Arch. Biochem.* 1960; 89: 281.
18. Oliver C.J., Pikk R.R., Cleave A.J., Peacocke A.R. Determination of the Diffusion Coefficient and Molecular Weight of Tamm-Horsfall Glycoprotein by Intensity Fluctuation Spectroscopy. *Biopolymers.* 2000; 10; 1971(9): 1731–3.
19. Viswanathan P., et al. Calcium oxalate monohydrate aggregation induced by aggregation of desialylated Tamm-Horsfall protein. *Urol. Res.* 2011; 39(4): 269–82.