

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.613-003.7:616.633.96

Ланда С.Б.¹, Аль-Шукри С.Х.², Горбачев М.И.³, Егоров В.В.⁴, Эмануэль Ю.В.², Эмануэль В.Л.²

ПАТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОЛИГОМЕРНЫХ ФОРМ БЕЛКА ТАММА-ХОРСФАЛЛА ПРИ УРОЛИТИАЗЕ

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт», 188300, Гатчина; ²ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, Санкт-Петербург; ³СПб ГБУЗ «Городская клиническая больница № 31», 197110, Санкт-Петербург; ⁴ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург

Изучена роль белка Тамма-Хорсфалла в патогенезе уролитиаза. Исследование олигомерных форм белка проведено методом динамического светорассеивания. Обследовано 57 пациентов с уролитиазом и 51 человек контрольной группы сопоставимого возраста и пола. Степень очистки БТХ контролировали с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ. Продемонстрирован обратимый переход олигомерной формы белка с размером молекулы 7 МДа в полимерную форму в 28 МДа при воздействии гуанидинхлорида. При уролитиазе выявлена форма белка, связанная с неорганическими компонентами, с размером макромолекулярного комплекса более 1500 нм. Предложен диагностический критерий уролитиаза по совокупности биохимических и биофизических исследований мочи.

Ключевые слова: уролитиаз; белок Тамма-Хорсфалла; динамическое светорассеивание; электрофорез, ИФА.

Для цитирования: Ланда С.Б., Аль-Шукри С.Х., Горбачев М.И., Егоров В.В., Эмануэль Ю.В., Эмануэль В.Л. Патохимические особенности олигомерных форм белка Тамма-Хорсфалла при уролитиазе. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (6): 335-341. DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-6-335-341

Landa S.B.¹, Al-Shukri S.H.², Gorbachev M.I.³, Egorov V.V.⁴, Emanuel Yu.V.², Emanuel V.L.¹

THE PATHOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF OLIGOMERIC FORMS OF TAMM-HOFSFALL PROTEIN UNDER UROLITHIASIS

¹The B.P. Konstantinov St. Petersburg institute of nuclear physics of the research center "Kurchatovskii institute", 188300 Gatchina, Russia; ²The I.P. Pavlov first St. Petersburg state medical university, 197022 St. Petersburg, Russia; ³The municipal clinical hospital № 31, 197111 St. Petersburg, Russia; ⁴The research institute of influenza of Minzdrav of Russia, 197376 St. Petersburg, Russia

The role of Tamm-Hoesfall protein in pathogenesis of urolithiasis was analyzed. The study of oligomeric forms of protein was carried out using technique of dynamic light scattering. The sampling of 57 patients with urolithiasis and 51 patients of control group of comparative age and gender were examined. The degree of purification of Tamm-Hoesfall protein was controlled using denaturant electrophoresis in polyacridine amy gel. The reversing change of oligomeric form of protein with molecule size 2 Mda in polymeric form 28 Mda under impact of guanidinhydrochloride. Under urolithiasis, the form of protein associated with non-organic components and with size of macromolecular complex larger than 1500 nm was detected. The diagnostic criterion of urolithiasis was proposed based on totality of biochemical and biophysical analyses of urine.

Keywords: urolithiasis; Tamm-Hoesfall protein; dynamic light scattering; electrophoresis; enzyme-linked immunosorbent assay

For citation: Landa S.B., Al-Shukri S.H., Gorbachev M.I., Egorov V.V., Emanuel Yu.V., Emanuel V.L. The pathochemical characteristics of oligomeric forms of Tamm-Hoesfall protein under urolithiasis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (6): 335-341. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-6-335-341

For correspondence: Emanuel V.L., doctor of medical sciences, professor, head of chair of clinical laboratory diagnostic with course of molecular medicine. e-mail: vladimirem@gmail.com

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Financing. The study had no sponsor support.

Received 01.09.2015
Accepted 15.12.2015

Введение. Нефролитиаз и сегодня относится к наиболее распространенным, тяжелым и часто рецидивирующим урологическим заболеваниям, представляющим серьезную проблему социального значения. Известно, что образование мочевых камней связано с физико-химическими процессами,

при которых происходит снижение порога растворимости солей или превышение их концентрации над порогом растворимости [1]. В моче присутствуют факторы, способные замедлять образование твердофазных структур, среди которых наибольшее значение придается белку Тамма-Хорсфалла (БТХ) [2].

БТХ является мажорным гликопротеином, обнаруженным в моче млекопитающих [3, 4]. Maxfield M. [5], используя вискозиметрию, центрифугирование в градиенте и индикатрисное светорассеивание, показал, что БТХ в различных условиях может существовать в разных олигомерных формах с различной ММ (Т&НЕ). Основная форма, обозначенная авторами как Т&НЕ(7), имеет ММ 7 MD и представляет собой гибкую

Для корреспонденции: Эмануэль Владимир Леонидович, д-р мед. наук, проф., зав. каф. клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, Санкт-Петербург, e-mail: vladimirem1@gmail.com

БИОХИМИЯ

нить диаметром 4—5 нм и длиной 600 нм, состоящую из 4 одинаковых линейных цепей. Диаметр каждой из цепочек, обозначенных авторами как T&HE → DF→, составляет 4 нм, а длина — 150 нм, ММ составляет 1,5—1,7 MD.

Олигомерная форма T&HDF (ММ: 3,1—3,5 MD) состоит из двух цепей T&HE→DF, при этом ее длина составляет 300 нм. Форма T&HE(7) получается при соединении «встык» двух цепей T&HDF. В растворе форма T&HE(7) собирается в статистический клубок с гидродинамическим радиусом $102,4 \pm 3,56$ нм. При повышении ионной силы раствора форма T&HE(7) образует еще одну полимерную форму — T&HE(28) из 4 нитей T&HE(7). Тетрамер T&HE(7) имеет ММ 28 MD, ширину 8—10 нм и длину 1200 нм. Жесткость T&HE(28) выше, чем у T&HE(7), и она никогда не образует статистического клубка.

Было высказано предположение о том, что ингибирование роста кристаллов в моче здоровых людей обусловлено, в основном, наличием в моче форм БТХ, имеющих полианионную структуру [6]. Отличие свойств БТХ больших уролитиазом, вероятно, связано с посттрансляционными модификациями степени сialiрования аминокислотных остатков [7, 8]. Частичное удаление сиаловых кислот БТХ с помощью обработки нейраминидазой приводило к потере ингибирующего эффекта на агрегацию кристаллов *in vitro* [9, 10].

Целью настоящего исследования стало изучение биофизических различий биохимических форм БТХ при уролитиазе.

Методика. Исследование проведено на биопробах 57 пациентов с уролитиазом, верифицированным в клинике урологии Санкт-Петербургского университета им. акад. И.П. Павлова при соблюдении правила информированного согласия на совокупность лечебно-диагностических услуг. Группу сравнения составил 51 человек без уролитиаза сопоставимого возраста и полового состава, также при условии информированного согласия на комплексное обследование.

Методы исследования. Выделение и очистка БТХ из мочи проводились модифицированным методом Тамма и Хорсфалла [3]: к 0,5 л мочи добавляли NaCl до конечной концентрации 0,6 М. После растворения соли образцы центрифугировали при 10 000 g в течение 30 минут при 4°C. Осадок ресуспендировали 5 мл PBS-буфера, добавляли 5 мл 0,5 М Na соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (рН 8,0). Ресуспендированный осадок мочи помещали в диализный мешок с размером пор до 30 кД. Диализ проводили в течение 24 ч против 1000—2000-кратного объема дистиллированной H₂O. После полного растворения осадка объем диализата доводили до 500 мл и снова повторяли процедуры высаливания и центрифугирования. Очищенный БТХ ресуспендировали 5 мл дистиллированной H₂O. Степень очистки БТХ контролировали с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по стандартной процедуре [11].

Исследование форм БТХ методом динамического светорассеяния. В основе метода лежит регистрация спектральных характеристик лазерного излучения, рассеянного частицами биологической жидкости при прохождении лазерного излучения через образец. При взаимодействии излучения со светорассеивающими частицами происходит изменение его частоты, зависящей от скорости движения частиц. Оценка скорости броуновского движения позволяет определять их гидродинамические размеры по формуле Стокса–Эйнштейна [12, 13]. Использование математического метода регуляризации [14] делает возможным распределение светорассеивающих частиц в биожидкости по размерам.

Исследование динамики разборки комплекса БТХ до мономеров проведено по изменению структурно-оптических характеристик раствора БТХ при воздействии гуанидинги-

дрохлорида в концентрации 6 М через 5 мин, 30 мин, 60 мин, 120 мин и 240 мин.

Результаты и обсуждение. Выделено три группы гистограмм распределения частиц БТХ по размерам — из мочи здоровых людей (рис. 1, а) и пациентов с уролитиазом (рис. 1, б, в).

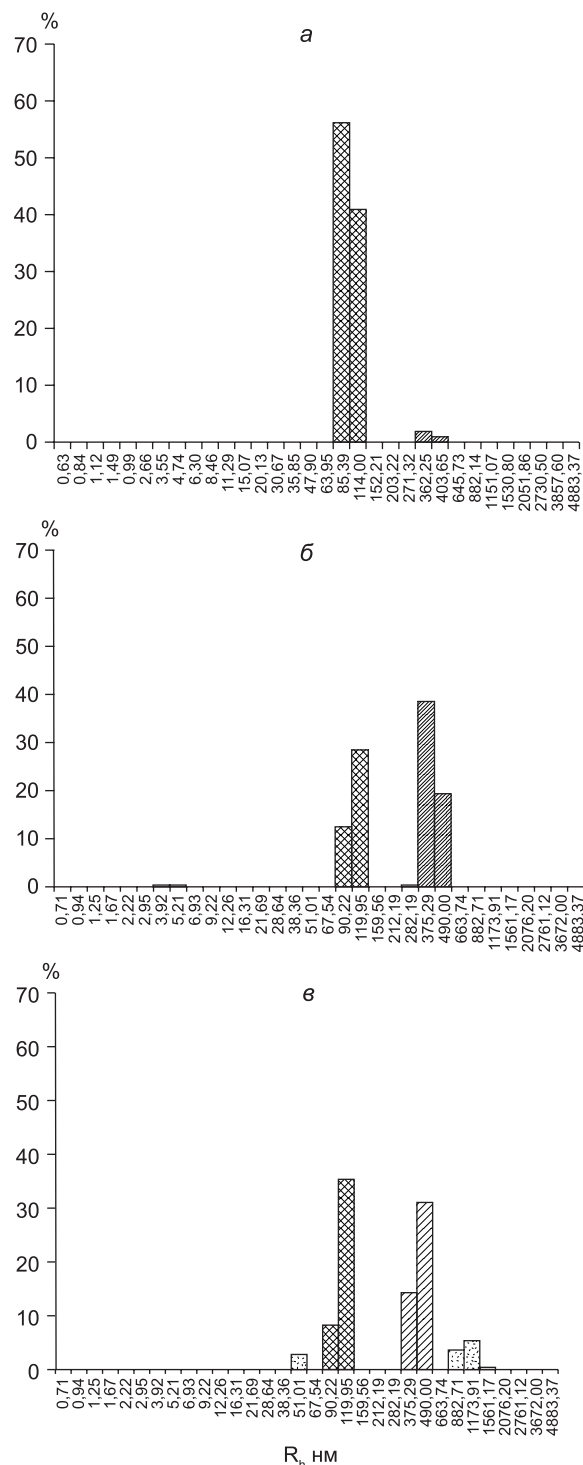


Рис. 1. Гистограмма распределения частиц по размерам образца БТХ, выделенного из мочи группы 1 (а), 2 (б) и 3 (в). По оси абсцисс — гидродинамический радиус R_h в нм, по оси ординат — вклад в рассеяние, %.

Биофизические характеристики образцов БТХ

Группа*	№ образца	Размер, нм	Вклад %	Размер, нм	Вклад, %	Размер, нм	Вклад, %	Размер, нм	Вклад, %	Размер, нм	Вклад, %
1	1	4,12 ± 0,38	0,7 ± 0,22	—	—	100,9 ± 4,76	98 ± 3,5	389 ± 17	1,3 ± 1,66	—	—
1	2	—	—	—	—	102,9 ± 6,31	95 ± 4,7	396 ± 23	5,0 ± 1,54	—	—
1	3	—	—	—	—	106,8 ± 2,03	95 ± 7,2	418 ± 18	4,6 ± 1,65	—	—
1	4	3,97 ± 0,45	0,6 ± 0,35	—	—	104,8 ± 5,40	94 ± 6,8	423 ± 19	5,4 ± 2,13	—	—
1**	5	—	—	—	—	97,9 ± 4,93	97 ± 2,6	388 ± 15	2,1 ± 0,93	—	—
1	6	4,02 ± 0,57	1,0 ± 0,56	—	—	101,25 ± 3,64	98 ± 3,1	412 ± 19	2,0 ± 1,71	—	—
1	7	—	—	—	—	102,05 ± 6,00	97 ± 8,4	415 ± 22	3,1 ± 2,55	—	—
1	8	—	—	—	—	103,3 ± 4,08	97 ± 3,7	414 ± 14	2,5 ± 1,78	—	—
1	9	—	—	—	—	101,8 ± 4,27	95 ± 5,6	384 ± 21	5,0 ± 3,12	—	—
1	10	4,07 ± 0,43	0,4 ± 0,35	—	—	104,2 ± 6,03	93 ± 5,5	383 ± 16	6,6 ± 4,01	—	—
1	Среднее	4,05	0,7	—	—	102,51	95,9	401	3,8	—	—
2	11	3,94 ± 0,32	1,06 ± 1,34	—	—	103,5 ± 4,53	47 ± 6,3	392 ± 12,9	52 ± 3,7	—	—
2	12	4,02 ± 0,25	1,05 ± 1,20	—	—	97,9 ± 5,46	43 ± 7,7	411 ± 10,1	56 ± 7,7	—	—
2**	13	3,96 ± 0,23	0,94 ± 0,36	—	—	105,2 ± 1,96	41 ± 2,4	402 ± 10,6	58 ± 1,9	—	—
2	15	3,92 ± 0,33	1,02 ± 1,08	—	—	101,9 ± 4,68	44 ± 2,1	407 ± 16,1	55 ± 2,2	—	—
2	16	3,99 ± 0,37	1,13 ± 1,23	—	—	101,2 ± 4,28	46 ± 8,2	394 ± 10,3	53 ± 13,6	—	—
2	19	4,04 ± 0,45	1,08 ± 1,34	—	—	97,4 ± 4,21	49 ± 5,3	412 ± 11,1	50 ± 14,7	—	—
2	20	4,09 ± 0,39	1,05 ± 1,37	—	—	99,3 ± 6,02	47 ± 8,3	416 ± 9,9	52 ± 12,2	—	—
2	Среднее	3,99	1,05	—	—	100,91	45,29	405	53,7	—	—
3	14	—	—	49,6 ± 1,21	2,1 ± 1,02	104,5 ± 3,32	37 ± 5,3	449 ± 11,9	49 ± 15,7	1021 ± 54	11,9 ± 3,94
3**	17	—	—	47,9 ± 0,1	2,6 ± 0,66	108,8 ± 1,72	43 ± 6,0	446 ± 10,3	45 ± 7,9	1073 ± 66	8,7 ± 3,33
3	18	—	—	52,5 ± 0,73	3,2 ± 0,79	99,3 ± 2,36	42 ± 6,9	455 ± 12,5	51 ± 12,4	1087 ± 61	3,8 ± 2,94
3	Среднее	—	—	50,00	2,63	104,20	41	450	48	1060	8,13

Примечание. * — группа 1 — здоровые, группы 2 и 3 — страдающие уролитиазом. ** — курсивом выделены данные, приведенные на рис. 1, а—в; 2, а—в и 3, а—в.

Основной вклад в светорассеяние в пробах здоровых лиц вносят частицы со средним гидродинамическим радиусом (R_h) 97,9 ± 4,93 нм: он составляет 97,3 ± 2,6%. Согласно С/Л. Oliver et al. [15], такой гидродинамический радиус имеют частицы с ММ порядка 7—9 MD. Кроме основного пика, на гистограмме отражен пик частиц с R_h 368 ± 35,0 нм с вкладом в светорассеяние в 2,6 ± 0,93%. Если принять утверждение о том, что линейные размеры жесткого цилиндра пропорциональны первой степени массы частиц (или их ММ), то увеличение ММ в 4 раза должно приводить к увеличению R_h также в 4 раза (около 400 нм). Таким образом, в первом случае мы фиксируем олигомерную форму Т&НЕ(7), а во втором — Т&НЕ(28) [16]. Данные по образцам БТХ у 10 человек контрольной группы (группа 1) и 10 пациентов с уролитиазом (группа 2) приведены в табл. 1.

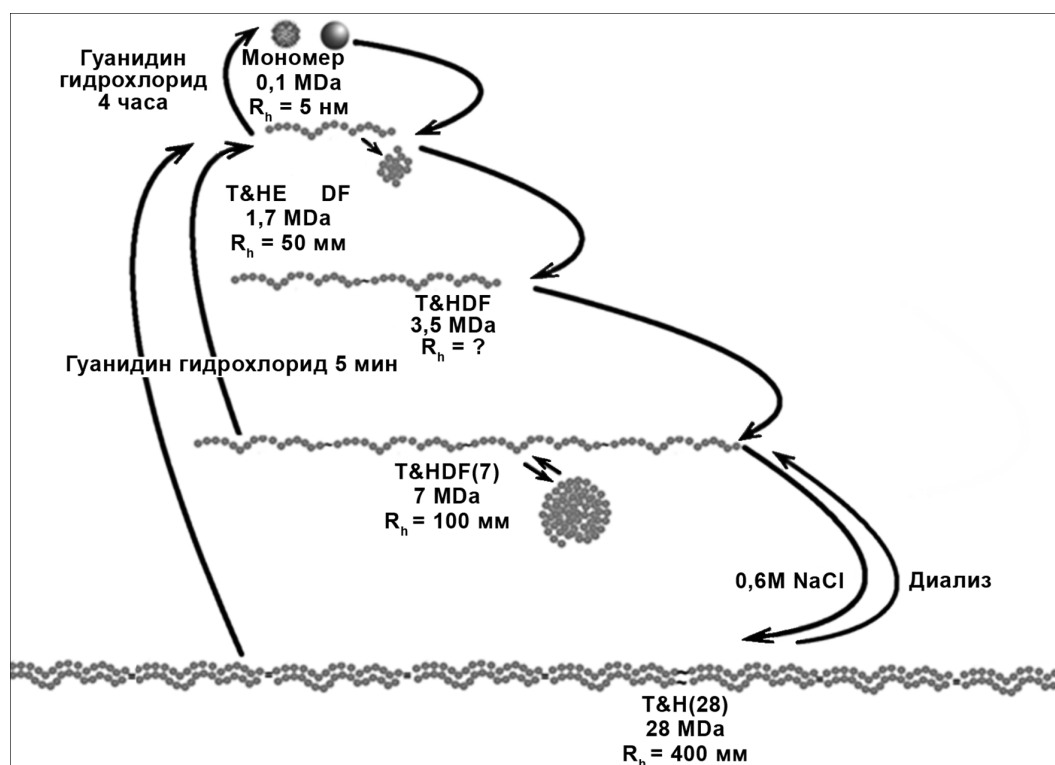
В пробах мочи больных уролитиазом, кроме олигомеров Т&НЕ(7) с R_h = 105,2 ± 1,96 нм, вклад которых в рассеяние составляет 41,1 ± 2,36%, присутствует значительное число олигомеров Т&НЕ(28) с R_h = 402 ± 10,6 нм, чей вклад в светорассеяние составляет 58,2 ± 1,94 %. Размер частицы с R_h 4,1 ± 0,44 нм характерен для следовых количеств альбумина [2], вклад в светорассеяние которых составляет всего 0,94 ± 0,36% (см. таблицу, группа 2).

Однако среди больных уролитиазом выделена еще одна группа, в которой регистрируется и другой тип распределения частиц по размерам (рис. 1, в). Кроме форм Т&НЕ(7) и Т&НЕ(28), в таких образцах встречаются крупные конгломераты, имеющие размер от 1500 нм и более. Такие частицы

труднорастворимы и не удаляются при диализе. При уролитиазе агрегация этой «свободной» формы БТХ — Т&НЕ(28)F с минеральными микрокристаллами образует нерастворимые комплексы, в дальнейшем обозначаемые нами как Т&НЕ(28) А. Из 10 проверенных образцов мочи больных уролитиазом такой тип распределения олигомерных форм наблюдался в трех случаях (см. табл. 1, группа 3). Кроме того, присутствуют частицы с R_h 47,9 нм с вкладом в рассеяние в среднем около 2%. Поскольку линейные размеры гауссового клубка пропорциональны квадратному корню из массы частиц (или их ММ), уменьшение R_h в 2 раза должно приводить к уменьшению ММ в 4 раза, т.е. она должна составлять примерно 1,5—1,7 MD.

Результаты исследования взаимных переходов различных олигомерных форм БТХ представлены на схеме. Для подтверждения такой схемы нами была проведена модуляция этих форм БТХ под влиянием гидрохлорида гуанидина, приводящая к диссоциации белковых комплексов до мономеров. На рис. 2, а приведена динамика диссоциации форм БТХ здорового человека. В первичном монодисперсном образце (97 ± 2,6% составляют частицы с R_h в 97,6 ± 3,71 нм) после добавления гидрохлорида гуанидина через 5 мин содержание этих частиц падает более чем в 10 раз до 7,5 ± 2,36%, а вместо них регистрируются частицы с R_h = 50,7 ± 2,68 нм со вкладом в 92,5 ± 2,68%. Иначе говоря, практически весь БТХ деградирует до формы Т&НЕ → DF.

После двух часов действия гидрохлорида гуанидина наблюдается заметное увеличение вклада в рассеяние частиц



Формы белка Тамма–Хорсфалла и их взаимные переходы.

размером $5,03 \pm 0,05$ нм в $17,6 \pm 3,8\%$: через 3 ч — до $75,1 \pm 3,75\%$, а через 4 ч он достигает практически 100% ($98,1 \pm 1,35$) (рис. 2, в—е). Эти частицы можно отнести к мономерам БТХ. Во-первых, потому, что за 4 ч действия хлористого гуанидина не появились более мелкие формы, т.е. диссоциация остановилась именно на этой стадии. Можно провести и сравнение отношения R_n к ММ альбумина (МВ = 65 кД, $R_n = 4$ нм). Однако поскольку в этом случае мы имеем дело не с гауссовыми клубками, а с глобулярными белками, ММ частиц будет пропорциональна кубу R_n . Таким образом, увеличение R_n в 1,2 раза (с 4 до 5 нм) должно приводить к увеличению ММ в 1,7 раза, т.е. примерно до 110 кД. Это хорошо согласуется как с нашими данными по денатурирующему электрофорезу БТХ (ММ мономеров в группе здоровых людей составляет $107,0 \pm 2,75$ кД, а в группе больных МКБ — $111,0 \pm 1,89$) (рис. 3), так и с данными литературных источников [14].

Разницы в динамике распада олигомерных форм в группах 1 и 2 не наблюдается. Таким образом, можно утверждать, что в динамике деградации олигомерных форм БТХ можно выделить две отчетливо различающиеся стадии:

- короткая стадия, длящаяся 5 мин: распад форм Т&НЕ(7) и Т&НЕ(28) до Т&НЕ → DF; форма Т&НЕ(28) распадается под действием детергентов и денатурирующих агентов так же легко, как и форма Т&НЕ(7);

- продолжительная стадия, длящаяся 4 ч: деградация Т&НЕ → DF до мономера. Распад олигомерной формы Т&НЕ → DF во всех трех группах происходит одинаково, следовательно, и сами эти формы не отличаются друг от друга.

Наличие двух стадий в процессе диссоциации олигомерных форм Т&НЕ(7) и Т&НЕ(28) можно объяснить существованием различных типов связей между мономерами внутри формы Т&НЕ @ DF и связей между этими формами. Как известно, большую часть мономера БТХ составляет так называемый ZP3-домен. Основная его роль — обеспечивать

полимеризацию белков-мономеров и образование в растворе гелеподобных структур [12]. Благодаря наличию двух β-листов, богатых неполярными аминокислотами, на мономере образуются две гидрофобные области. В водной среде мономеры соединяются так, чтобы гидрофобные поверхности имели минимальную площадь. По-видимому, 16—17 мономеров, образующих форму Т&НЕ → DF, — это минимальное число, необходимое для того, чтобы максимально «спрятать» гидрофобные участки мономеров. Именно поэтому олигомерные формы достаточно легко диссоциируют до формы Т&НЕ → DF, сама же форма, связанная более прочными гидрофобными взаимодействиями, значительно более устойчива к действию 6М хлористого гуанидина.

Основную протекторную функцию в моче несут формы Т&НЕ(7) и Т&НЕ(28). Для верификации адаптационных и патологических процессов при изменении условий мочеобразования необходимо изучение модификации биофизических свойств БТХ в зависимости от состава мочи.

По совокупности полученных данных для диагностики уrolитиаза предложен следующий алгоритм. Пробу мочи разделяют на два одинаковых образца и к одному из них добавляют реагент для идентификации БТХ, в качестве которого используют специфические антитела к БТХ, вступающие с ним в иммунно-аффинную реакцию, и белок А из *Staphylococcus aureus*, иммобилизованный на агарозных микросферах. Белок А неспецифически связывает иммуноглобулины с F-доменом тяжелых цепей, которые, в свою очередь, специфически связывают БТХ. Эту пробу мочи со специфическими антителами к БТХ центрифугируют для осаждения всех форм БТХ. Далее с помощью метода динамического светорассеяния получают гистограммы распределения частиц по размерам в обоих образцах. Путем сравнения гистограмм распределения обеих проб идентифицируют олигомерные формы БТХ — Т&Н(7) в диапазо-

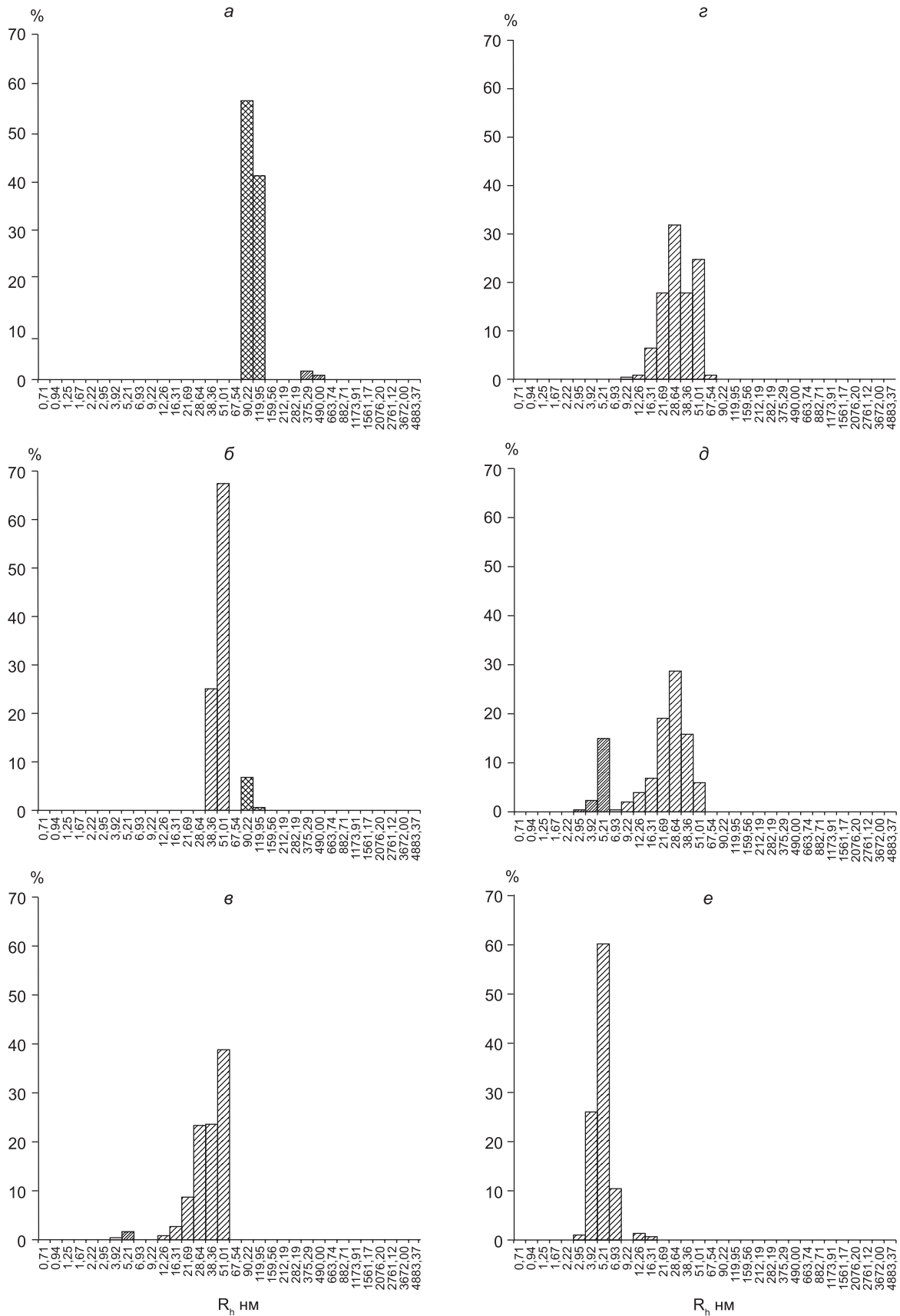


Рис. 2. Динамика диссоциации олигомерных форм образца БТХ. *a* — исходный образец, *б* — через 5 мин, *в* — через 30 мин, *г* — через 60 мин, *д* — через 120 мин, *е* — через 240 мин после добавления 6 М хлористого гуанидина. По оси абсцисс — гидродинамический радиус R_h в нм, по оси ординат — вклад в рассеяние, %.

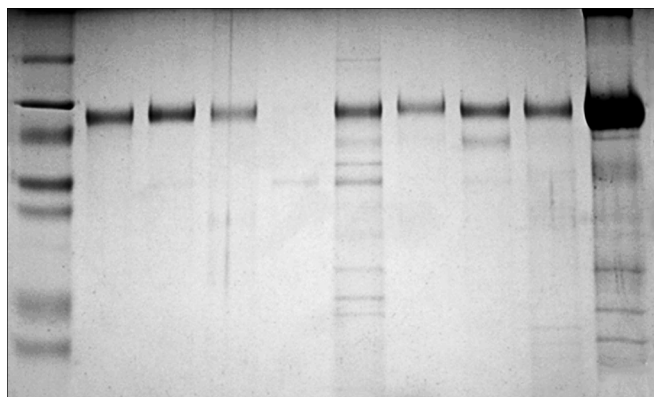


Рис. 3. Денатурирующий электрофорез БТХ в ПААГ. Окраска — коллоидный Кумасси. Дорожка 1 — маркеры молекулярного веса (180, 116, 90, 58, 48, 36.5, 26.6 kD). Дорожки 2—4 — БТХ группы здоровых людей, дорожки 6—10 — БТХ больных уролитиазом.

не R_h 90 ÷ 110 нм, Т&Н(28)F в диапазоне R_h 370 ÷ 500 нм, Т&Н(28)А в диапазоне R_h 1500 ÷ 5000 нм — по наличию соответствующих пиков на гистограмме нативной мочи (т.е. в образце, оставленном без воздействий) и одновременно отсутствию данных пиков на гистограмме супернатанта другого образца. Затем определяют вклад в суммарное рассеяние (в %) олигомерных форм БТХ путем расчета площадей под соответствующими пиками по отношению к суммарной площади всех пиков на гистограмме.

Выявленные нами преобладание при уролитиазе формы Т&Н(28), наличие свободной Т&Н(28)F и связанной с неорганическими компонентами Т&Н(28)А послужили основаниями для расчета диагностических критериев уролитиаза — соотношения вкладов в рассеяние форм Т&Н(28)А/Т&Н(7) (коэффициент C_1) и Т&Н(28)F/Т&Н(7) (коэффициент C_2). ROC-анализ позволяет установить величины решающего порога (cut off) для этих коэффициентов [3].

Исходя из величин решающего порога, уролитиаз диагностируют следующим образом:

- при $C_1 < 0,1$ и $C_2 < 1,81$ констатируют отсутствие заболевания;
- при $C_1 < 1,5$ и $C_2 > 1,81$ диагностируют группу риска развития уролитиаза;
- при соотношении $C_1 > 1,5$ и любом значении C_2 диагностируют наличие уролитиаза.

Так как биофизический метод динамического светорассеяния пока не получил широкого распространения, мы провели его валидацию верифицированным биохимическим методом. В образцах БТХ, выделенных из мочи здоровых людей и больных уролитиазом, проводили определение концентрации БТХ методом SDS-электрофореза, как описано в [13]. Такой подход позволяет разделить формы Т&Н(7) и Т&Н(28), так как при центрифугировании осажается исключительно форма Т&Н(28). Таким образом, при первом центрифугировании выделяется форма Т&Н(28), а затем, в результате обработки 0,6 М NaCl, форма Т&Н(7) переводится в форму Т&Н(28), которая и выделяется.

Результаты вышеописанного подхода представлены на рис. 4 и 5. На рис. 4, а приведены фотографии осадков после первого и второго центрифугирования здорового человека, а на рис. 4, б, в — больных уролитиазом (1-я и 2-я группа, соответственно).

Даже невооруженным глазом видно, что в случае здорового человека БТХ накапливается в осадке 2, тогда как

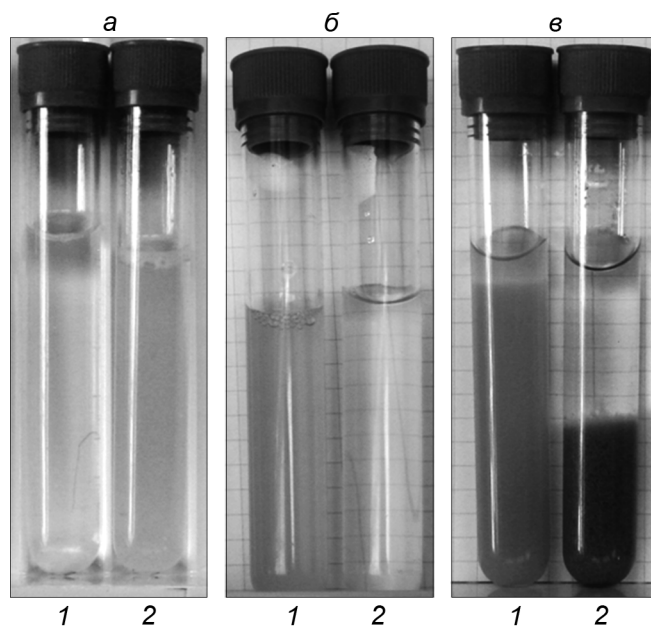


Рис. 4. Осадки, полученные после первого и второго центрифугирования мочи здорового человека (а) и больных уролитиазом (б и в).

у больных уролитиазом — в осадке 1. Подтверждают это и данные электрофореза (рис. 5). Кроме того, обратим внимание на отсутствие БТХ в супернатанте во всех образцах (дорожки 3).

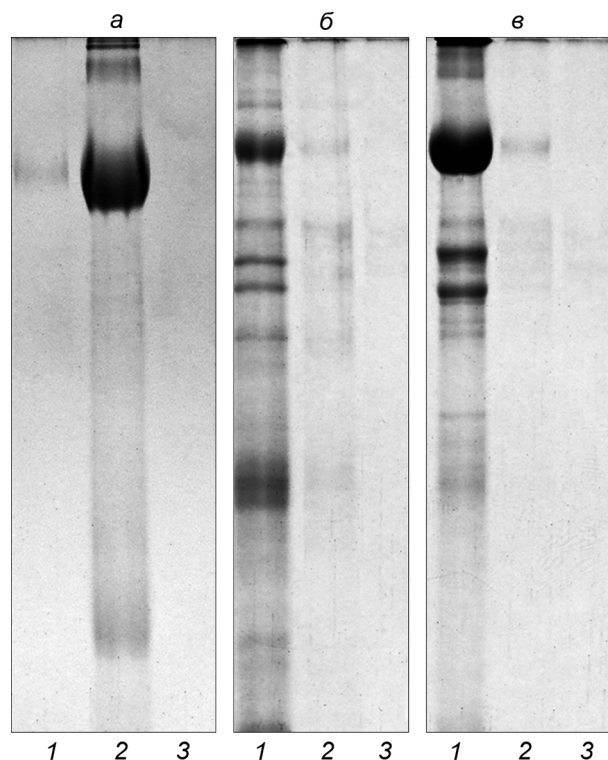


Рис. 5. Денатурирующий электрофорез осадка 1 — дорожка 1, осадка 2 — дорожка 2 и супернатанта — дорожка 3, здорового человека (а) и больных уролитиазом (б и в).

Соотношение оптических плотностей полос БТХ на дорожках 1 и 2 (аналог коэффициента C_2 для метода динамического светорассеяния) для здоровых людей составляло $0,17 \pm 0,036$ ($n = 10$), а для больных уролитиазом — $25,46 \pm 3,764$ ($n = 10$). Конечно, для характеристики cut off необходима большая выборка, однако эти качественные совпадения обоих методов подтверждает информативность расчета соотношений олигомерных форм БТХ у здоровых и больных уролитиазом методом динамического светорассеяния.

Заключение. Итак, уже вполне определенно можно говорить, что наличие формы Т&Н(28)А характерно для уролитиаза, так как она содержит макромолекулярные соединения органического матрикса (БТХ Т&Н(28)) и неорганического лиганда (чаще всего, оксалат кальция). Эти макромолекулы, переходя в состояние геля, становятся центром кристаллизации солей, образования конкрементов с последующей их верификацией инструментальными методами и развития клиники мочекаменной болезни. Свойства динамической биофизической системы «золь» — «гель», состоящей из форм БТХ Т&Н(28), могут продолжительное время индивидуально сохранять свойства «золя», способствуя выведению значительного количества микрокристаллов в форме БТХ Т&Н(28)А. Частое увеличение концентрации солей щавелевой кислоты, в том числе при повышении осмоляльности мочи, а также приближение рН мочи к изоэлектрической точке БТХ приводят к сдвигу системы в зону «геля» с последующим запуском процесса кристаллизации и образования конгломератов в мочевых путях. Диагностическая эффективность метода составила 98%.

Таким образом, сочетание специфической биохимической и высокочувствительной биофизической технологий позволяет выявлять наличие биологического дефекта системы саногенеза, т.е. условия для патологического кристаллообразования.

Исследование проводится при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» в 2009—2013 гг. по теме «Определение характеристик белка Тамма—Хорсфалла для оценки риска уролитиаза с разработкой диагностических лабораторных методов скрининга и вторичной профилактики мочекаменной болезни».

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4—16 см. REFERENCES)

1. Бажора Ю.И., Носкин Л.А. *Лазерная корреляционная спектроскопия в медицине*. Одесса: Друк; 2002.
2. Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В., Носкин В.А. *Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии*. Киев: Наукова Думка; 1987.
3. Власов В.В. *Введение в доказательную медицину*. М.: Медиасфера; 2000.

Поступила 01.09.15

REFERENCES

1. Bazhora Yu.I., Noskin L.A. *Laser Correlation Spectroscopy in Medicine [Lazernaya korrelyatsionnaya spektroskopiya v meditsine]*. Odessa: Druk; 2002. (in Russian)
2. Lebedev A.D., Levchuk Yu.N., Lomakin A.V., Noskin V.A. *Laser Correlation Spectroscopy in Biology [Lazernaya korrelyatsionnaya spektroskopiya v biologii]*. Kiev: Naukova Dumka; 1987. (in Russian)
3. Vlasov V.V. *Introduction to Evidence-Based Medicine [Vvedenie v dokazatel'nyu meditsinu]*. Moscow: Mediasfera; 2000. (in Russian)
4. Chen W.C., Lin H.S., Chen H.Y., Shin C.H., Li C.W. Effects of Tamm-Horsfall protein and albumin on calcium oxalate crystallization and importance of sialic acids. *Mol. Urol.* 2001; 5 (1): 1—5.
5. Coe F.L., Evan A., Worcester E. Kidney stone disease. *J. Clin. Invest.* 2005; 115 (10): 2598—608.
6. Dubin S.B., Feher G., Benedek G.B. Study of the chemical denaturation of lysozyme by optical mixing spectroscopy. *Biochemistry.* 1973; 12 (4): 714—20.
7. Dunstan D.R., Grant A.M., Marshall R.D., Neuberger A. A protein, immunologically similar to Tamm-Horsfall glycoprotein, produced by cultured baby hamster kidney cells. *Proc. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1974; 186 (1085): 297—316.
8. Fellstrom B., Danielson B.G., Ljunghall S., Wikstrom B. Crystal inhibition: the effects of polyanions on calcium oxalate crystal growth. *Clin. Chim. Acta.* 1986; 158 (3): 229—35.
9. Fletcher A.P., Neuberger A., Ratcliffe W.A. Tamm—Horsfall urinary glycoprotein. The chemical composition. *Biochem. J.* 1970; 120 (2): 417—24.
10. Fletcher A.P., Neuberger A., Ratcliffe W.A. Tamm—Horsfall urinary glycoprotein. The subunit structure. *Biochem. J.* 1970; 120 (2): 425—32.
11. Hallson P.C., Choong S.K., Kasidas G.P., Samuell C.T. Effects of Tamm-Horsfall protein with normal and reduced sialic acid content upon the crystallization of calcium phosphate and calcium oxalate in human urine. *Br. J. Urol.* 1997; 80 (4): 533—8.
12. Jovine L., Qi H., Williams Z., Litscher E.S., Wassarman P.M. A duplicated motif controls assembly of zona pellucida domain proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101 (16): 5922—7.
13. Lau W.H., Leong W.S., Zhari I., Gam L.H. Gam SDS-PAGE-Based Quantitative Assay for Screening of Kidney Stone Disease. *Biol. Proced. Online.* 2009; 11: 145—60.
14. Maxfield M. Fractionation of the urinary mucoprotein of Tamm and Horsfall. *Arch. Biochem. Biophys.* 1960; 89 (2): 281—8.
15. 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.* 1971; 10 (9): 1731—3.
16. Maxfield M., Wolins W. A molecular abnormality of urinary mucoprotein in cystic fibrosis of the pancreas. *J. Clin. Invest.* 1962; 41: 455—62.

Received 01.09.15