

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Верлов Н.А.¹, Бурдаков В.С.¹, Кулаков И.А.¹, Ланда С.Б.¹, Ронжина Н.Л.¹, Богданов А.А.², Эмануэль В.Л.³

НОВЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ УРОВНЯ УРОМОДУЛИНА В МОЧЕ

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

² ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический) имени Н.П. Напалкова», 197758, г. Санкт-Петербург, Россия;

³ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия

Уромодулин является белком, играющим важную роль в регулировании водного и ионного баланса в организме. В норме он присутствует в моче в высокой концентрации и может служить индикатором ряда патологических состояний. Стандартным подходом к оценке концентрации уромодулина является иммуноферментный анализ, однако склонность уромодулина к полимеризации приводит к тому, что результаты анализа в существенной степени зависят от конкретной процедуры пробоподготовки. В связи с этим нами предложен новый подход к измерению концентрации уромодулина в моче, основанный на измерении концентрации общего белка в образцах мочи до и после фильтрации с использованием фильтра 300 кДа. Данный метод основан на биофизических свойствах уромодулина, в частности, на его способности образовывать высокомолекулярные олигомеры. Концентрация полимеризованного уромодулина рассчитывается как разность концентраций белка до и после фильтрации. Преимущество данного подхода заключается в его простоте и доступности, результаты сравнительных исследований показали эквивалентность предложенного метода и иммуноферментного анализа. Таким образом, новый подход к измерению концентрации уромодулина с использованием фильтрации может стать важным инструментом для медицинских исследований и диагностики заболеваний.

Ключевые слова: уромодулин; концентрация белка; фильтрация; электрофорез; капиллярный электрофорез.

Для цитирования: Верлов Н.А., Бурдаков В.С., Кулаков И.А., Ланда С.Б., Ронжина Н.Л., Богданов А.А., Эмануэль В.Л. Новый подход к оценке уровня уромодулина в моче. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (12): 728-734. DOI: <https://doi.org/10.51620.0869-2084-2023-68-12-728-734>

Для корреспонденции: Верлов Николай Александрович, канд. биол. наук, зав. Ресурсным Центром Отделения молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ; e-mail: verlov_na@pnpi.nrcki.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121060200125-2).

Поступила 16.10.2023

Принята к печати 14.11.2023

Опубликовано 00.12.2023

Verlov N.A.^{1,3}, Burdakov V.S.¹, Kulakov I.A.¹, Landa S.B.^{1,3}, Ronzhina, N.L.¹, Bogdanov A.A.², Emanuel V.L.³

A NEW APPROACH TO ASSESSING THE LEVEL OF UROMODULIN IN URINE

¹ Federal State Budgetary Institution "Petersburg Institute of Nuclear Physics named after V.I. B.P. Konstantinov National Research Center Kurchatov Institute;

² State Budgetary Institution of Health Care "St. Petersburg Clinical Scientific and Practical Center for Specialized Types of Medical Care (Oncological)";

³ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Uromodulin is the protein that plays an important role in a regulation of water and ion balance in a body. Normally, it is present in a urine in high concentration and can be an indicator of a number of pathological conditions. The standard approach to assess the concentration of uromodulin is the enzyme immunoassay. However, the tendency of uromodulin to polymerize leads to the fact that the results of the analysis significantly depend on the specific sample preparation procedure. In this regard, we have proposed the new approach to measure the concentration of the uromodulin in the urine. It is based on measuring the concentration of total protein in urine samples before and after filtration with a 300 kDa filter. This method is based on the biophysical properties of uromodulin, in particular, on its ability to form high-molecular oligomers. The concentration of polymerized uromodulin is calculated as the difference in protein concentrations before and after filtration. The advantage of this approach is in its simplicity and accessibility. The results of comparative studies have shown the equivalence of the proposed method and the enzyme immunoassay. Thus, a new approach to measure the concentration of uromodulin using filtration can become an important tool for medical researches and diagnosis of diseases.

Key words: uromodulin; protein concentration; filtration; electrophoresis; capillary electrophoresis.

For citation: Verlov N.A., Burdakov V.S., Kulakov I.A., Landa S.B., Ronzhina N.L., Bogdanov A.A., Emanuel V.L. A new approach to assessing the level of uromodulin in urine. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (12): 728-734. (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620.0869-2084-2023-68-12-728-734>

For correspondence: Verlov Nikolay Alexandrovich, Cand. Sc. Biol., head. The Resource Center of the Molecular and Radiation Biophysics Division of NRC "Kurchatov Institute" – PNPI; e-mail: verlov_na@pnpi.nrcki.ru

Information about authors:

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

Burdakov V.S., <https://orcid.org/0000-0001-6025-7367>;

Kulakov I.A., <https://orcid.org/0009-0003-5952-4773>;

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

Ronzhina N.L., <https://orcid.org/0000-0001-6269-8502>;

Bogdanov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-7887-4635>;

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

Conflict of interests. *The authors declare no conflict of interests.*

Acknowledgment. *The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (theme № 121060200125-2).*

Received 16.10.2023

Accepted 14.11.2023

Published 00.12.2023

Введение. Биомаркеры мочи представляют собой важный инструмент для диагностики, классификации и прогнозирования заболеваний почек [1]. Проведенные исследования показали, что уромодулин является биомаркером мочи, его уровень отражает функциональное состояние почек, выраженность патологии при хронической болезни почек (ХБП) и гипертонии [2]. К функциям уромодулина можно отнести защиту от инфекций мочевыводящих путей, предотвращение образования почечных камней за счёт ингибирования процессов первичного кристаллогенеза и агрегации кристаллов кальция, регуляцию транспорта ионов посредством регулирования активности совместного транспортера натрия-калия-хлорида (NKCC2) и/или калиевого канала ROMK [3, 4]. Мутации в гене UMOD, кодирующем уромодулин, ответственны за ряд моногенных расстройств (семейная ювенильная гиперурикемическая нефропатия, медулярно-кистозная болезнь почек 2-го типа или гломеруло-кистозная болезнь почек), известных как уромодулин-ассоциированные заболевания почек (UAKD) и гипертонии [2]. Эти расстройства характеризуются тяжелым тубулоинтерстициальным повреждением, гиперурикемией и подагрой, а также прогрессирующей почечной недостаточностью [5]. Ряд общегеномных ассоциативных исследований показал, что варианты модификаций в гене UMOD связаны с маркерами функции почек и риском развития артериальной гипертензии и ХБП в человеческой популяции [6 - 8]. Связь уромодулина, как с моногенными заболеваниями, так и со сложными нарушениями, такими как ХБП и артериальная гипертензия, обуславливает высокий интерес к белку и методам определения его концентрации в моче для оценки функции почек.

Уромодулин представляет собой гликопротеин, который экспрессируется исключительно клетками почечного эпителия, выстилающего полость толстого восходящего сегмента петли Генле и начало дистального сегмента извитого канальца. В норме уромодулин составляет более половины массы от общего белка в моче [9 - 11]. Уромодулин является уникальным белком, который вследствие высокой степени гликозилирования, характеризуется изоэлектрической точкой

pI = 3,2 [10], склонный в широком диапазоне ионного окружения, характерного для мочи, образовывать высокоорганизованные фибриллы, состоящие из сотен и тысяч мономеров [12]. Белок в процессе посттрансляционного созревания в эндоплазматическом ретикулуме подвергается N-гликозилированию. Гликозилированию подвергаются 7 сайтов из 8, что во многом определяет структуру белка и его электроотрицательные свойства. Перед выходом в просвет канальца к C-концу присоединяется гликозилфосфатидилинитол (GPI-якорь), который удерживает молекулу на поверхности мембраны. Образование свободно циркулирующего мономера уромодулина происходит при взаимодействии белка с сериновой протеазой – хепсином, активность которой растет при увеличении концентрации одновалентных катионов в моче [13]. Хепсин отрезает от C-конца уромодулина 26 аминокислотных остатков вместе с GPI-якорем, вследствие чего у него активизируется ZP-домен, ответственный за полимеризацию [14]. В результате мономеры массой 95 кДа образуют олигомеры массой до 10 МДа [15, 16].

Олигомеры уромодулина обуславливают множество его важных функций, начиная от стабилизации коллоида мочи в широком диапазоне концентрации солей, растворенных в моче, заканчивая выраженными антимикробными свойствами. Тем не менее, помимо полимеризованного уромодулина в моче может быть обнаружен прекурсор уромодулина с ZP-доменом, закрытым для полимеризации GPI-якорем. Концентрация неполимеризованного прекурсора в моче и в крови примерно в тысячу раз ниже, чем концентрация полимеризованного уромодулина в моче. Так, молекула уромодулина, способного к полимеризации, состоит из 614 остатков аминокислот и её масса составляет 105 кДа, тогда как молекула прекурсора уромодулина, иммобилизованного на мембране с помощью GPI-якоря, состоит из 640 аминокислот и её масса составляет около 110 кДа [17].

Стандартным методом определения уромодулина является иммуоферментный анализ [18], однако склонность белка к образованию олигомеров служит существенным препятствием для количественного определения его концентрации в моче [19]. Несмо-

тря на довольно быстрое получение и характеристику антител, специфичных к уромодулину человека [20], сообщения об определении концентрации уромодулина давали противоречивые результаты с точки зрения стабильности, в различных условиях хранения и протоколах преаналитической обработки исходного образца [19, 21 - 23].

Целью настоящего исследования была разработка и апробация подхода для оценки концентрации полимеризованного уромодулина в моче, не основанного на иммуноферментном анализе.

Материал и методы. Исследование проводили на образцах мочи, полученных от 20 здоровых добровольцев (12 мужчин, 8 женщин, средний возраст 38 ± 10 лет). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИЦ “Курчатовский институт” - ПИ-ЯФ. Для анализа использовали образцы утренней мочи. Для всех образцов проводили разделение объемов, часть образца использовали для последующего анализа в нативном виде, часть подвергали фильтрации на фильтре 300 кДа (Biomax 300 KDa Ultrafiltration disks, Millipore) с использованием системы вакуумной фильтрации (MilliSolve™ Filtration System, Millipore).

Общеклинический анализ мочи проводили с использованием тест-полосок Labstrip U11 Plus GL на анализаторе мочи DocUReader 2 Pro (77 Elektronika Kft, Венгрия). Определяли следующие параметры: билирубин, уробилиноген, кетоны (ацетоуксусная кислота), аскорбиновая кислота, глюкоза, протеин (альбумин), эритроциты (гемоглобин), уровень pH, нитриты, лейкоциты, удельный вес мочи.

Измерение фракционного состава коллоида нативной мочи и образца после фильтрации проводили на анализаторе треков наночастиц NanoSight LM10 (Malvern). Анализ треков наночастиц (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) представляет собой метод, позволяющий определить коэффициент диффузии частиц в растворе. Для этого исследуемый образец помещается в кювету, которая освещается лазерным лучом, развернутым в плоскость. Рассеяние света на каждой из частиц в плоском пучке света создает дифракционные пятна. По изменению положения геометрического центра пятна во времени можно определить скорость перемещения частицы в жидкости и рассчитать коэффициент диффузии. Зная коэффициент диффузии частицы и свойства жидкости, можно рассчитать гидродинамический размер частиц в исследуемом образце и получить гистограмму распределения частиц по размерам, при этом метод позволяет определить их концентрацию в абсолютных величинах (частиц в мл). Перед измерением образцы мочи разводили в 40 раз дистиллированной водой. В качестве источника излучения использовали лазер с длиной волны 488 нм, для каждого образца проводили 3 последовательных измерения длительностью по 60 секунд.

Определение массовой концентрации ионов аммония, калия, натрия, лития, магния, стронция, бария и кальция проводили методом капиллярного электрофореза с использованием системы КАПЕЛЬ-105М (Льюмэкс, Россия). Свежесобранные образцы мочи для анализа центрифугировали при 1800g 5 минут, отбирали супернатант, для анализа разбавляли его деионизированной водой (удельное электрическое сопротивление

>16 МОм·см) в 250 раз.

Одномерный электрофорез проводили в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) с концентрацией полиакриламида 10 % в разделяющем геле и 5 % в концентрирующем геле. Анализируемые образцы помещали в стандартный буфер для нанесения (0,065 М Трис; pH = 6,8; 2 % SDS, 1% дитиотреитол (ДТТ), 10 % глицерин; 0,01 % бромфеноловый голубой) и прогревали на кипящей водяной бане в течение 2 минут. Образцы наносили в количестве 10 мкг на дорожку. Разделение проводили в камере для вертикального гель-электрофореза MidiPage (Clever Scientific, Великобритания) при постоянной мощности 3 Вт на гель.

Концентрацию общего белка образцов определяли колориметрическим методом по Бредфорду (Bradford protein assay, BioRad, США) [24] и флуориметрическим методом с использованием флуоресцентного красителя ProteOrange (Lumiprobe, Россия). Для определения концентрации белка по методу Бредфорда в одноразовых оптических кюветках смешивали 800 мкл реактива Бредфорда и 200 мкл исследуемого образца и через 5 минут проводили измерение светопоглощения при длине волны 595 нм с использованием спектрофлуориметра F-7000 (Hitachi, Япония). Концентрацию белка рассчитывали по калибровочной кривой для известных концентраций человеческого сывороточного альбумина. Для флуориметрического определения концентрации белка в лунки 96-луночного планшета добавляли по 10 мкл раствора ProteOrange в фосфатно-солевом буфере и по 90 мкл образца в трехкратных повторениях, а также человеческий сывороточный альбумин в серии разведений для построения калибровочной кривой. Измерения проводили на многофункциональном планшетном анализаторе EnSpire Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, США) в режиме детекции флуоресценции при длинах волн возбуждения и испускания 470 и 570 нм соответственно. Построение калибровочной кривой и расчет концентрации белка производили с использованием встроенного программного обеспечения анализатора. Также в образцах нативной и фильтрованной мочи определяли концентрацию белка методом с пирогаллоловым красным с использованием набора реагентов Белок-ППК (Вектор-Бест, Россия) на автоматическом биохимическом анализаторе А-15 (BioSystems, Испания).

Имуноферментный анализ для определения концентрации уромодулина в исследуемых образцах проводили с использованием набора Human Uromodulin ELISA kit (BioVendor, Чехия). Для анализа применяли как стандартную процедуру подготовки образца перед измерением, так и процедуру с применением буфера ТЕА (сок. Triton, EDTA, Alkaline). Для приготовления буфера ТЕА использовали 0,5 % Triton X-100 и 20 мМ/л EDTA, полученную смесь титровали 40 % NaOH до pH 7,5 [19].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета R language (R version 4.2.1) в среде RStudio (2023.06.2 Build 561, Posit Software, PBC). Для групповых сравнений количественных показателей использовали параметрические критерии Фишера и Стьюдента и непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки согласия количественных методов измерений применяли график

Бланда-Альтмана [25].

Результаты. Измеренные значения плотности, pH, проводимости и катионного состава исследованных образцов приведены в табл. 1. Сравнение параметров об-

разцов мочи до и после фильтрации не выявило достоверных отличий. В целом можно сделать заключение, что фильтрация с использованием фильтра 300 кДа не оказывает влияния на оцениваемые параметры мочи.

Таблица 1

Данные измерения физических свойств нативной и фильтрованной мочи

Показатель	Нативная моча, n = 20 (95% CI)	Фильтр 300 кДа, n = 20 (95% CI)	p-value
Плотность, г/см ³	1,02 (1,01; 1,02)	1,01 (1,00; 1,02)	0,8
pH	5,7 (5,44; 5,98)	5,7 (5,42; 5,94)	0,8
Проводимость, мкСм/см	9,34 (8,46; 10,21)	9,38 (8,60; 10,15)	>0,9
Конц. Na ⁺ , мг/мл	2,56 (2,26; 2,85)	2,39 (2,13; 2,65)	0,2
Конц. K ⁺ , мг/мл	1,67 (1,30; 2,05)	1,58 (1,30; 1,86)	0,8
Конц. Ca ⁺ , мг/мл	0,13 (0,10; 0,17)	0,13 (0,10; 0,17)	>0,9
Конц. NH ₄ ⁺ , мг/мл	0,61 (0,47; 0,76)	0,61 (0,50; 0,72)	0,6

Таблица 2

Концентрация белка в образцах нативной и фильтрованной мочи

Метод определения	Нативная моча, мг/л n = 20 (95% CI)	Фильтр 300 кДа, мг/л n = 20 (95% CI)	p-value
Пирогаллоловый красный	40,9 (33,2; 48,7)	30,8 (23,3; 38,3)	0,093
Флуориметрический метод	35,44 (27,60; 43,28)	24,43 (17,95; 30,91)	0,007
Метод Бредфорда	34,64 (26,81; 42,46)	23,67 (17,27; 30,06)	0,010

Таблица 3

Изменение концентрации белка (ΔK) в моче после фильтрации

Метод определения	ΔK, мг/л, n = 20 (95% CI)
Пирогаллоловый красный	11,10 (7,86; 12,49)
Флуориметрический метод	10,73 (9,34; 12,68)
Метод Бредфорда	11,05 (9,05; 12,89)

Таблица 4

Концентрация уромодулина, определенная иммуноферментным методом по стандартному протоколу (ELISA) и с применением буфера TEA (ELISA + TEA)

Протокол измерений	Концентрация белка, мкг/мл, n = 20 (95% CI)
ELISA, нативная моча	6,12 (5,37; 7,40)
ELISA, фильтрат мочи (до 300 кДа)	0,65 (0,64; 0,76)
ELISA + TEA, нативная моча	10,92 (9,43; 14,35)
ELISA + TEA, фильтрат мочи (до 300 кДа)	0,63 (0,62; 0,81)
ΔK, ELISA	5,48 (4,68; 6,70)
ΔK, ELISA + TEA	10,29 (8,79; 13,58)

Концентрации белка, измеренные методом с пирогаллоловым красным, методом Бредфорда и флуориметрическим методом, в образцах нативной мочи и в образцах мочи после фильтрации приведены в табл. 2. Оценка уровня белка в образцах нативной и фильтрованной мочи методом Бредфорда и флуориметрическим методом дала очень близкие значения, что совпадает с опубликованными данными о сравнении этих методов.

Для каждой пары «нативная моча - фильтрованная моча» производили расчёт потери белка по формуле $\Delta K = K_{\text{нативная}} - K_{300\text{кДа}}$, где ΔK - изменение концентрации белка после фильтрации образца, $K_{\text{нативная}}$ - концентрация общего белка в образце нативной мочи и $K_{300\text{кДа}}$ - концентрация белка в образце после пропускания через фильтр 300 кДа. Расчёт падения концентрации белка проводился во всех образцах для метода с пирогаллоловым красным, метода Бредфорда и флуориметрического метода. Расчетные данные об изменении концентрации белка в образце мочи приведены в табл. 3.

Данные о концентрации уромодулина полученные методом ИФА в образцах до и после фильтрации приведены в табл. 4. Применение буфера TEA при пробоподготовке нативной мочи приводит к увеличению детектируемой концентрации уромодулина примерно в 2 раза. Концентрация уромодулина, определяемая в образце фильтрованной мочи (фильтр пропускал белки с м.м. до 300 кДа), не изменяется в зависимости от применения буфера TEA при пробоподготовке к иммуноферментному анализу.

На электрофореграмме образца нативной мочи (рис. 1) детектируется две основные полосы в области 67 и 105 кДа, соответствующие альбумину и уромодулину [27].

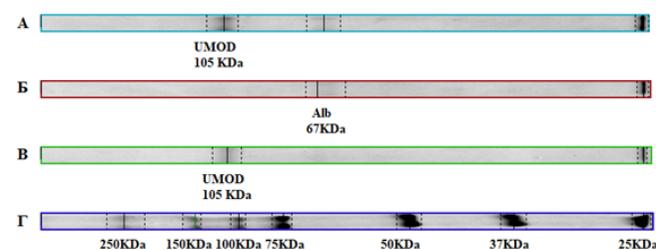


Рис. 1. Электрофореграмма образца нативной мочи (А); образца мочи после фильтрации (фильтр 300 кДа) (Б); смыва с фильтра после фильтрации нативной мочи (В); маркер молекулярных масс (Bio-Rad) (Г).

Для оценки фракционного состава коллоида нативной мочи и образца после фильтрации для каждого из образцов проводили серию измерений на анализаторе треков наночастиц. Гистограмма измерений и данные о концентрации частиц в образцах нативной мочи приведены на рис. 2. Концентрация частиц в образцах нативной мочи составляла $(3,4 \pm 0,28) \cdot 10^{10}$ частиц/мл, в образце после фильтрации падала в 50 раз до уровня фонового значения, предварительно

измеренного для буфера разбавления $(6,8 \pm 0,8) \cdot 10^8$ частиц/мл (фон $3,4 \cdot 10^8$ частиц/мл). Распределение частиц по размерам для образцов до фильтрации характеризовалось гладкой кривой с нарастанием концентрации частиц и достижением максимума в области 130 нм (мода распределения $130 \pm 3,2$ нм) и гладким спадом до 400 нм. Распределение частиц в образцах после фильтрации отличалось низким соотношением сигнал-шум.

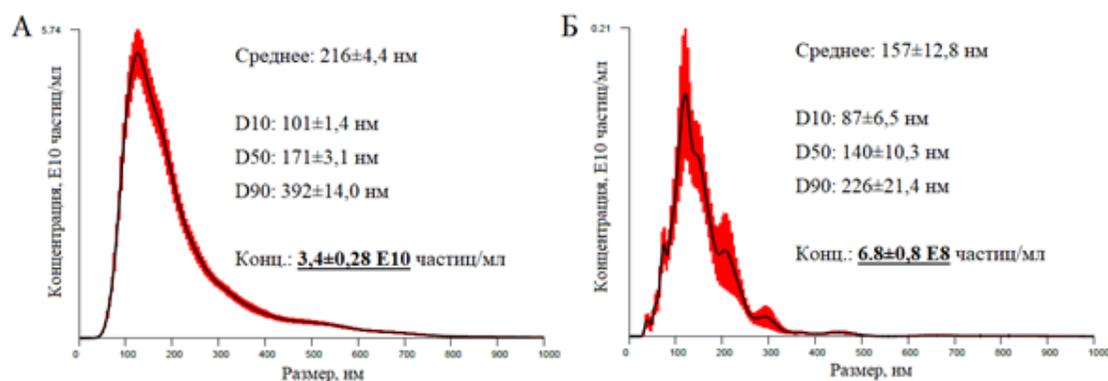


Рис. 2. Данные о фракционном составе коллоида мочи до (А) и после фильтрации (Б), полученные методом анализа треков наночастиц.

Обсуждение. Целью настоящего исследования была разработка подхода для оценки концентрации уромодулина в моче, не основанного на иммуноферментном анализе. С учетом основных биофизических свойств уромодулина нами разработан подход к оценке количества полимеризованного уромодулина в моче, основанный на измерении концентрации белка в образце мочи до и после фильтрации на мембране 300 кДа. Данные, представленные в табл. 2 и табл. 3, показывают, что определение концентрации белка с использованием пирогаллолового красного, методом Бредфорда и флуориметрическим методами дает сопоставимые величины как в нативной, так и в фильтрованной моче. Зная композицию главных белков мочи, мы сделали предположение, что основные белковые компоненты мочи, такие как альбумин (объемная доля до 40%, масса мономера 67 кДа) и IgG (объемная доля до 5%, масса 150 - 170 кДа), должны свободно проходить через мембрану фильтра 300 кДа. Вторичная моча формируется из первичной мочи, которая является ультрафильтратом, прошедшим через фильтрационные щели, образованные ножками подоцитов, покрывающими клубочковые капилляры в капсуле Боумана [28]. Таким образом можно ожидать, что среди белков, попавших в мочу из плазмы крови, отсутствуют компоненты с молекулярной массой больше 200-300 кДа. Тем не менее, при фильтрации на фильтре 300 кДа (Biotech 300 KDa Ultrafiltration disks, Millipore) наблюдается снижение концентрации белка в образце. На электрофореграмме также видно, что полоса, соответствующая массе уромодулина, практически исчезает в образце прошедшем через фильтр. Вместе с тем, зная порог молекулярной массы белка, попадающего в первичную мочу в капсуле Боумана, можно предположить, что фракция, не прошедшая через фильтр, относится к белку, синтезированному в нефроне. На основании вышеизложенного мы предполагаем, что изменение концентрации белка в

образце после фильтрации равно концентрации полимеризованного уромодулина в нативной моче.

Для того, чтобы оценить эквивалентность методов определения концентрации полимеризованного уромодулина в моче, мы провели сравнение величин снижения концентрации белка после фильтрации через фильтр 300 кДа с результатами определения концентрации уромодулина в образце мочи до и после фильтрации. На рис. 3 приведены данные относительно изменения количества белка (Δ ОБ) при фильтрации и данные прямого измерения концентрации белка иммуноферментным методом. Изменение количества белка при фильтрации показывает лучшее совпадение с данными иммуноферментного анализа с применением буфера ТЕА. Концентрация уромодулина, определенная иммуноферментным методом без применения буфера ТЕА, дает недооценку концентрации, которая обусловлена тем, что олигомеры уромодулина не в полном объеме переведены в форму мономеров.

Для регрессионного анализа мы взяли данные иммуноферментного анализа с использованием буфера ТЕА и данные падения концентрации белка с использованием различных методов определения. Данные линейной регрессии приведены на рис. 4, коэффициент корреляции по Пирсону для флуориметрического определения белка и определения методом Бредфорда $R = 0,93$ ($p < 0,05$), для определения с пирогаллоловым красным $R = 0,62$ ($p < 0,05$).

Графики Бланда-Альтмана для сравнения методов приведены на рис. 5. На представленных графиках показаны результаты определения концентрации полимеризованного уромодулина по количеству общего белка мочи до и после фильтрации на мембране 300 кДа и данными иммуноферментного анализа. Видно, что смещение каждого из трёх методов определения белка в моче не превосходит 1 мг/л. Наибольшая ширина доверительно-го интервала оказалась у метода определения белка с ис-

пользованием пирогаллолового красного (CI95%: -7,92; 7,81), тогда как диапазон согласия для флуориметриче-

ского метода и метода Бредфорда в два раза уже (CI95%: -4,28; 2,95 и CI95%: -4,96; 3,14, соответственно).

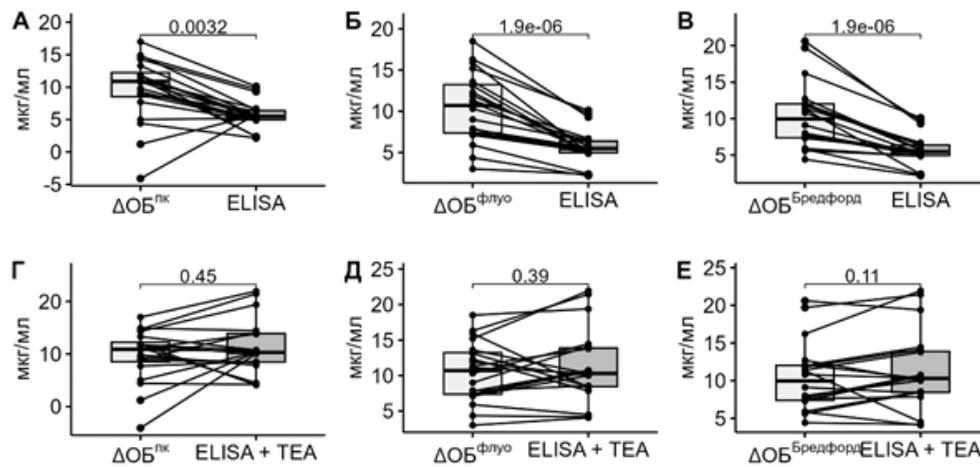


Рис. 3. Данные падения концентрации белка, измеренной различными методами (А, Г – пирогаллоловым красным, Б, Д - флуориметрическим методом, В, Е – по Бредфорду), с данными иммуноферментного анализа (А, Б, В) и иммуноферментного анализа с использованием буфера TEA (Г, Д, Е).

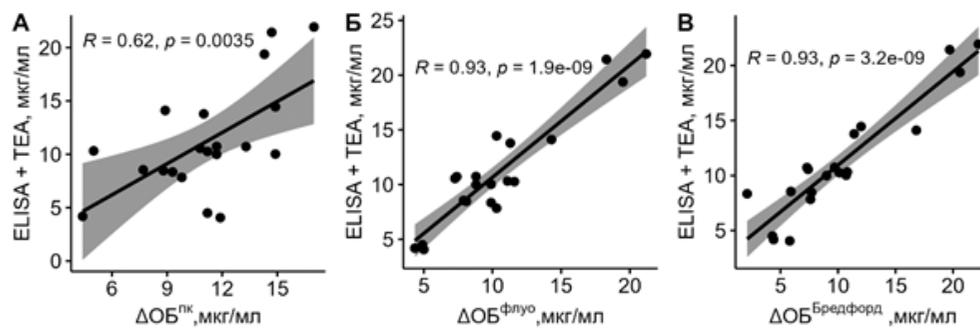


Рис. 4. Данные регрессионного анализа и коэффициенты корреляции по Пирсону для данных падения концентрации белка при фильтрации (ΔОБ) различными методами (А – пирогаллоловым красным, Б - флуориметрическим методом, В – по Бредфорду) в сравнении с данными иммуноферментного анализа с использованием буфера TEA.

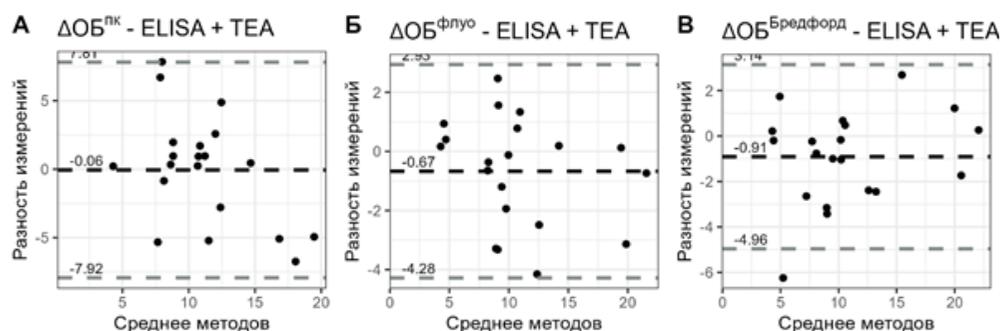


Рис. 5. Графики Бланда-Альтмана для данных падения концентрации белка при фильтрации (ΔОБ) различными методами (А – пирогаллоловым красным, Б - флуориметрическим методом, В – по Бредфорду) в сравнении с данными иммуноферментного анализа с использованием буфера TEA.

Заключение. Нами продемонстрирована применимость метода определения концентрации полимеризованного уромодулина в моче, основанного на использовании фильтра 300 кДа и определении концентрации белка в образцах мочи до и после фильтрации. Смещение среднего в сравнении с иммуноферментным определением концентрации уромодулина, независимо

от метода определения концентрации общего белка, не превышало 1 мг/л, наименьший диапазон различий был у флуориметрического метода и метода определения концентрации белка по Бредфорду. Предлагаемый нами подход к определению концентрации уромодулина обладает рядом преимуществ по сравнению с иммуноферментным анализом, так как он менее чув-

ствителен к процедуре пробоподготовки образцов для исследования, может быть проведен с использованием стандартных лабораторных методов. Сочетание двух методов определения концентрации уромодулина с использованием фильтрации и иммуноферментного анализа позволяет получить информацию о соотношении полимеризованного уромодулина и его мономеров, не склонных к полимеризации из-за закрытого ZP-домена. Соотношение концентрации полимеризованного уромодулина, концентрация которого в моче зависит от ряда факторов, но во многом определяется активностью протеазы хепсина, чувствительного к концентрации одновалентных катионов, и содержания мономеров уромодулина, чей выход в просвет петли Генле не зависит от ионного состава мочи, потенциально является важным показателем, характеризующим как функцию нефрона, так и выраженность адаптивных механизмов стабилизации коллоида мочи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Koyner J.L., Vaidya V.S., Bennett M.R., Ma Q., Worcester E., Akhter S.A. et al. Urinary biomarkers in the clinical prognosis and early detection of acute kidney injury. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 5 (12): 2154-65.
- Rampoldi L., Scolari F., Amoroso A., Ghiggeri G., Devuyst O. The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): from tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2011; 80 (4): 338-47.
- Renigunta A., Renigunta V., Saritas T., Decher N., Mutig K., Waldegger S. Tamm-Horsfall glycoprotein interacts with renal outer medullary potassium channel ROMK2 and regulates its function. *J. Biol. Chem.* 2011; 286 (3): 2224-35.
- Mutig K., Kahl T., Saritas T., Godes M., Persson P., Bates J. et al. Activation of the bumetanide-sensitive Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter (NKCC2) is facilitated by Tamm-Horsfall protein in a chloride-sensitive manner. *J. Biol. Chem.* 2011; 286 (34): 30200-10.
- Bollée G., Dahan K., Flamant M., Morinière V., Pawtowski A., Heidet, L., et al. Phenotype and outcome in hereditary tubulointerstitial nephritis secondary to UMOD mutations. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2011; 6 (10): 2429-38.
- Padmanabhan S., Melander O., Johnson T., Di Blasio A.M., Lee W.K., Gentilini D. et al. Genome-wide association study of blood pressure extremes identifies variant near UMOD associated with hypertension. *PLoS Genet.* 2010; 6 (10): e1001177.
- Köttgen A., Glazer N.L., Dehghan A., Hwang S.J., Katz R., Li M. et al. Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nat. Genet.* 2009; 41 (6): 712-7.
- Chambers J.C., Zhang W., Lord G.M., van der Harst P., Lawlor D.A., Sehmi J.S. et al. Genetic loci influencing kidney function and chronic kidney disease. *Nat. Genet.* 2010; 42 (5): 373-5.
- Devuyst O., Olinger E., Rampoldi L. Uromodulin: from physiology to rare and complex kidney disorders. *Nat Rev Nephrol.* 2017; 13 (9): 525-44.
- Schaeffer C., Devuyst O., Rampoldi L. Uromodulin: Roles in Health and Disease. *Annu. Rev. Physiol.* 2021; 83: 477-501.
- Micanovic R., LaFavers K., Garimella P.S., Wu X.R., El-Achkar T.M. Uromodulin (Tamm-Horsfall protein): guardian of urinary and systemic homeostasis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2020; 35 (1): 33-43.
- LaFavers K.A., Micanovic R., Sabo A.R., Maghak L.A., El-Achkar T.M. Evolving Concepts in Uromodulin Biology, Physiology, and Its Role in Disease: a Tale of Two Forms. *Hypertension.* 2022; 79 (11): 2409-18.
- Brunati M., Perucca S., Han L., Cattaneo A., Consolato F., Andolfo A. et al. The serine protease hepsin mediates urinary secretion and polymerisation of Zona Pellucida domain protein uromodulin. *Elife.* 2015; 4: e08887.
- Jovine L., Qi H., Williams Z., Litscher E., Wassarman P.M. The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nat. Cell. Biol.* 2002; 4 (6): 457-61.
- 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.
- Stanisich J., Zyla D., Afanasyev P., Xu J., Kipp A., Olinger E. et al. The cryo-EM structure of the human uromodulin filament core reveals a unique assembly mechanism. *ELife.* 2020; 9: e60265.
- Schaeffer C., Santambrogio S., Perucca S., Casari G., Rampoldi L. Analysis of uromodulin polymerization provides new insights into the mechanisms regulating ZP domain-mediated protein assembly. *Mol. Biol. Cell.* 2009; 20 (2): 589-99.
- Youhanna S., Weber J., Beaujean V., Glaudemans B., Sobek J., Devuyst O. Determination of uromodulin in human urine: influence of storage and processing. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2014; 29 (1): 136-45.
- Kobayashi K., Fukuoka S. Conditions for solubilization of Tamm-Horsfall protein/uromodulin in human urine and establishment of a sensitive and accurate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001; 388 (1): 113-20.
- Brunisholz M., Geniteau-Legendre M., Ronco P.M., Moullier P., Pontillon F., Richet G. et al. Characterization of monoclonal antibodies specific for human Tamm-Horsfall protein. *Kidney Int.* 1986; 29 (5): 971-6.
- Akesson I., Haugen H., Enger E. Quantification of uromucoid: a simplified method. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1978; 38 (1): 93-5.
- Uto I., Ishimatsu T., Hirayama H., Ueda S., Tsuruta J., Kambara T. Determination of urinary Tamm-Horsfall protein by ELISA using a maleimide method for enzyme-antibody conjugation. *J. Immunol. Methods.* 1991; 138 (1): 87-94.
- Torffvit O., Agardh C.D., Kjellsson B., Wieslander J. Tubular secretion of Tamm-Horsfall protein in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus using a simplified enzyme linked immunoassay. *Clin. Chim. Acta.* 1992; 205 (1-2): 31-41.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-54.
- Bland J.M., Altman D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986; 1 (8476): 307-10.
- KarunK.M.,Puranika.BA.plot:AnRfunctionforBland-Altmananalysis. *Clin. Epidemiol. Glob. Health.* 2021; 12: 100831.
- Li H., Kostel S., DiMartino S., Gheinani A.H., Froehlich J., Lee R. Uromodulin Isolation and Its N-Glycosylation Analysis by NanoLC-MS/MS. *J. Proteome Res.* 2021; 20 (5): 2662-72.
- Scott R.P., Quaggin S.E. Review series: The cell biology of renal filtration. *J. Cell Biol.* 2015; 209(2):199-210.