

УДК 577.3

## ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ ИЗОФОРМ УРОМОДУЛИНА

© 2023 г. А.В. Яковлева<sup>\*,#</sup>, Н.А. Верлов<sup>\*\*</sup>, М.Г. Залеский<sup>\*</sup>, С.Б. Ланда<sup>\*,\*\*</sup>,  
В.В. Шаповалов<sup>\*\*\*</sup>, В.Л. Эмануэль<sup>\*</sup>

*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» МЗ РФ,  
ул. Льва Толстого, 6–8, Санкт-Петербург, 197022, Россия*

*\*\*Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»,  
мкр. Орлова роща, 1, Гатчина, Ленинградская обл., 188300, Россия*

*\*\*\*Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина),  
ул. Профессора Попова, 5, Санкт-Петербург, 197376, Россия*

*#E-mail: gi\_ns@mail.ru*

Поступила в редакцию 30.12.2022 г.

После доработки 30.12.2022 г.

Принята к публикации 11.01.2023 г.

Изучение изоформ уромодулина проведено различными биофизическими методами в условиях экспериментальных моделей мочеобразования (ионный состав, осмолярность, pH) при наличии интактного уромодулина и его изоформ, выделенного у больных уролитиазом. Проведена апробация модели медицинского изделия для скрининга лиц с доклинической формой уролитиаза. Выдвинута концепция таргетной терапии уролитиаза, основанной на модуляции свойств уромодулина.

*Ключевые слова:* уролитиаз, уромодулин, белок Тамма–Хорсфалла, динамическое светорассеяние, pH, катионы, осмолярность, лабораторная диагностика.

**DOI:** 10.31857/S0006302923030225, **EDN:** FTHEXU

Одним из видов гомеостаза является устойчивость коллоидного состояния биологических сред организма, нарушение которой приводит к образованию кристаллических тел — эндоцитогенезу [1].

Однако кристаллизация минеральных компонентов в моче возникает прежде всего при снижении ее коллоидной устойчивости, что подтверждается тем, что в моче здорового человека содержится существенно больше коллоидного материала, чем в моче больных мочекаменной болезнью [2].

Уникальные биофизические свойства уромодулина [3], его гелеобразная и/или молекулярная сито-подобная структура рассматривается как основа для обеспечения коллоидно-осмотических свойств мочи, которые и обуславливают способность ингибировать образование камней путем предотвращения адгезии кристаллоидов [4, 5].

Образование в моче гелеобразного осадка — криогеля под действием понижения температуры свидетельствует о присутствии в моче высокомолекулярного соединения [6]. В этой связи необходимо идентифицировать криогель с известными

диагностически значимыми белками мочи. Исследования, выполненные М.Г. Залеским [7] на 4155 пробах мочи доказали, что основные биохимические характеристики уромодулина и криогеля холодной пробы мочи совпадают: и тот и другой являются гликопротеидами богатыми сиаловыми кислотами, и уромодулин и криогель при изменении концентрации солей в моче одинаково проявляют свои свойства.

Для разработки доказательной базы таргетной терапии разработан дизайн, основанный на концепции патогенеза уролитиаза, как реализации посттрансляционных дефектов уромодулина с изменением его биофизических свойств, приводящих к снижению коллоидной устойчивости мочи.

Целью исследования явилось изучение биофизического феномена фазового перехода «золь–гель» изоформ уромодулина.

Задачи исследования:

1. Исследование биофизических свойств уромодулина в моделях мочи с различным ионным составом и наличием изоформ уромодулина, выделенного у здоровых лиц и пациентов с уролити-

азом, а в перспективе и различными вариантами патологии.

2. Верификация фотометрической технологии объективной регистрации фазового перехода «золь—гель» при стандартизованном процессе охлаждения мочи до 4°C.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Характеристика клинических групп.** В работе использован биоматериал, аликвотированный из биопроб пациентов, наблюдавшихся в специализированном урологическом отделении клиники Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского Университета им. акад. И.П. Павлова. Также был использован биологический материал аликвотированный из биопроб пациентов, проходящих обследование на базе Научно-методического Центра молекулярной медицины МЗ РФ. Банк образцов хранили при температуре -20°C. Верификацию диагноза проводили на основании комплекса клинических признаков и данных инструментального обследования. Комплекс лабораторной диагностики включал исследование мочевого синдрома, функционального состояния почек и микробиологическое исследование мочи. В исследуемую группу в подавляющем большинстве были включены пациенты с оксалатным уролитиазом. По данным общего анализа мочи были отобраны образцы с рН в пределах от 5.5 до 6.5; учитывались результаты «Литос-системы» [8]. Было обследовано 100 пациентов — 48 мужчин (48%) и 52 женщины (52%). Средний возраст больных составил  $45.3 \pm 9.8$  лет. Контрольную группу составило 40 практически здоровых добровольцев — 20 женщин в возрасте от 19 до 52 лет и 20 мужчин в возрасте от 21 до 49 лет.

**Аналитические методы исследований.** Были использованы следующие методы:

1. Метод динамического светорассеивания — лазерная корреляционная спектроскопия для определения гидродинамических размеров биологических объектов на анализаторе ЛКС-03 («ИНТОКС», Россия) [9].

2. Технология «Литос-система». Принцип метода состоит в способности кристаллообразующего вещества модифицировать процесс образования кристаллов при добавлении его в кристаллообразующий раствор. (Приказ МЗ РФ № 17 от 21 января 1997 г.) [8].

3. Исследование Z-потенциала по измерению электрофоретической подвижности частиц с использованием эффекта Доплера, определение молекулярной массы по интенсивности рассеянного света с применением графика Дебая и оценка динамики этих характеристик при изменении рН и ионной силы с метрологической прослежи-

ваемостью к стандартам NIST (анализатор Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Великобритания). Метрологические характеристики технологии: размер частиц и молекул — диапазон от 0.3 нм до 10.0 микрон, точность  $\pm 2\%$ , воспроизводимость  $\pm 2\%$  при использовании латексных образцов, соответствующих стандартам NIST; дзета-потенциал — диапазон измерения от 3.8 нм до 100 мкм, точность 0.12 мкм см/В-с для водных систем при использовании эталонного материала SRM1980 по стандартам NIST, чувствительность 10 мг/мл; абсолютная молекулярная масса — диапазон измерения от 980 Да до 20 МДа, точность  $\pm 10\%$ .

**3. Методы медицинской информатики.** Статистический анализ проводили с помощью пакета StatGraphics Plus for Windows v. 5.0 для сравнительного анализа гистограмм распределений значений показателей, кросс-табуляции, однофакторного дисперсионного анализа. Применяли тесты и критерии: критерий согласия Колмогорова-Смирнова, *t*-критерий для сравнения средних, тест Манна-Уитни, тест Chi-Square (критерий хи-квадрат).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были созданы модельные растворы, имитирующие состав мочи с содержанием ионов в различных концентрациях и наличием физиологических концентраций уромодулина, выделенного у здоровых лиц, и белка Тамма-Хорсфалла у пациентов с уролитиазом. Модели мочи содержали NaCl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  и мочевины в количествах, обеспечивающих плотность 1.010 (300 мосмоль/л), 1.017 (650 мосмоль/л) и 1.030 (1000 мосмоль/л). Во всех пробах модельных растворов мочи концентрация уромодулина составляла около 30–50 мг/л.

Методом динамического светорассеивания выявлено, что у здоровых лиц преобладает олигомерная форма уромодулина как при низкой осмолярности (95% при 300 мосмоль/л), так и при очень высокой осмолярности (75% при 1000 мосмоль/л). Уромодулин из мочи пациента с уролитиазом даже при осмолярности, соответствующей высокой гидратации организма или гипостенурии — 300 мосмоль/л, присутствует на 60% в полимерной форме уромодулина (28 МДа), а в концентрированной моче (1000 мосмоль/л) является подавляющим — 95% [10].

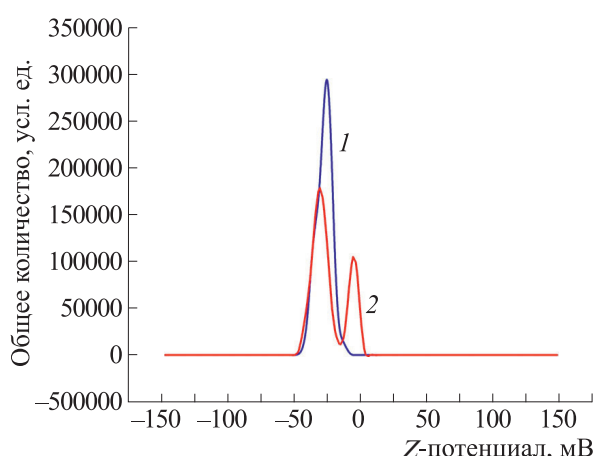
В табл. 1 представлены результаты измерений наличия изоформ уромодулина и Z-потенциала в биопробах мочи, полученных от лиц контрольной группы и пациентов с уролитиазом, помещенных в модельные растворы, имитирующие ионный состав мочи различной насыщенности, т.е. различной осмотической концентрации.

**Таблица 1.** Динамика относительного содержания изоформ уромодулина (%), выделенного из мочи здоровых лиц и пациентов с уролитиазом и Z-потенциала макромолекул при изменении осмотической концентрации модельных солевых растворов уромодулин (7) – олигомерная форма уромодулина в виде гауссова клубка

| Осмолярность       | 300 мосмоль/л     |                    |                 | 650 мосмоль/л     |                    |                 | 1000 мосмоль/л    |                    |                 |
|--------------------|-------------------|--------------------|-----------------|-------------------|--------------------|-----------------|-------------------|--------------------|-----------------|
| Уромодулин         | Уромодулин (7), % | Уромодулин (28), % | Z-потенциал, мВ | Уромодулин (7), % | Уромодулин (28), % | Z-потенциал, мВ | Уромодулин (7), % | Уромодулин (28), % | Z-потенциал, мВ |
| Контрольная группа | 95                | 5                  | –30             | 90                | 10                 | –24             | 75                | 25                 | –6              |
| Уролитиаз          | 40                | 60                 | –10             | 25                | 75                 | –8              | 5                 | 95                 | –2              |

На рис. 1 представлены результаты измерения Z-потенциала пула уромодулина, выделенного из мочи здоровых лиц (кривая 1, формирует один пик) и лиц, страдающих уролитиазом (кривая 2, формирует два пика). Как видно из рисунка, уромодулин в моче здоровых лиц имеет отчетливый отрицательный заряд около –30 мВ, а кривая зависимости уромодулина из мочи больных уролитиазом имеет два пика. Один из пиков почти совпадает с кривой, характерной для интактного уромодулина, т.е. имеет отрицательный заряд около –30 мВ, а треть макромолекул, фактически лишена отрицательного заряда. Результирующая величина Z-потенциала пула уромодулина, выделенного из мочи пациентов с уролитиазом, снижена до –24 мВ.

Полученные данные подтверждают концепцию роли величины сialiрирования уромодулина как фактора стабильности коллоидных систем [11] в условиях изменчивости процесса мочеобразования и существенных колебаний величины pH и ионной силы. При величине Z-потенциала ниже –30 мВ система начинает терять устойчивость,



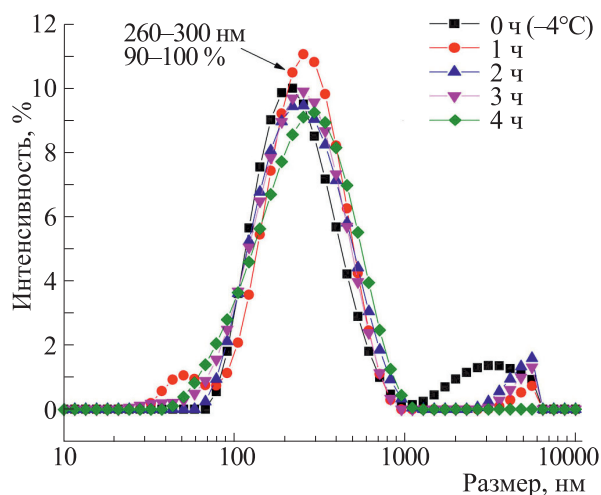
**Рис. 1.** Значение Z-потенциала макромолекул изоформ уромодулина из мочи здоровых лиц и пациентов с уролитиазом.

а при величине ниже –10 мВ начинается массовая агрегация наночастиц в коллоидных системах. Десиализация уромодулина на 40 % приводит к изменению pH на 1.5–1.9 единиц, что может свидетельствовать о снижении Z-потенциала десилированного уромодулина до критических величин.

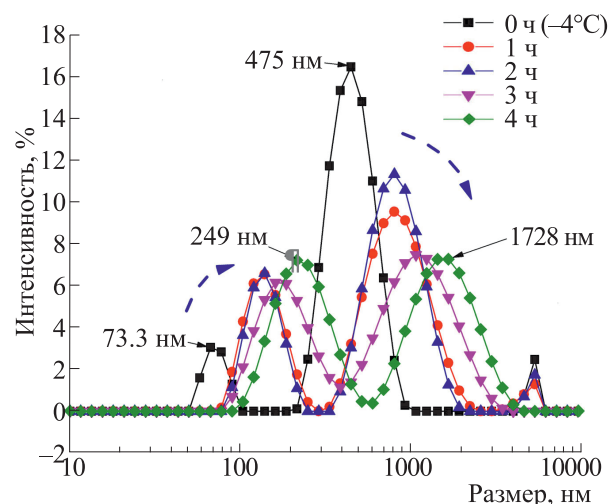
Использованный метод обладает высокой точностью, специфичностью и чувствительностью, но требует больших трудозатрат и времени исследования, а главное – остается трудоемкой технологией, поскольку выполняется на сложном прецизионном средстве измерения, позволяющем проводить измерение размеров частиц в нативных биологических жидкостях в нанодиапазоне (от единиц до тысяч нм). Результаты применения этой технологии позволили валидировать биофизическую лабораторную технологию для верификации десилированной формы уромодулина.

Для верификации описанного феномена образования криогеля в пробах мочи, полученной от пациентов с уролитиазом, проведено измерение размеров молекул уромодулина в процессе охлаждения пробы до 4°C. Как видно из рис. 2, при охлаждении уромодулина из мочи здоровых лиц изменение размера частиц не происходит, в то время как уромодулин из мочи пациентов с уролитиазом (рис. 3) прогрессивно увеличивает гидродинамический размер, измеренный методом динамического светорассеивания.

Для валидации феномена фазового перехода «золя» в «гель» разработана модель медицинского изделия «Уроскрин» – анализатор регистрации образования «криогеля мочи» при выполнении «холодовой пробы мочи» по патенту М.Г. Залеского [6]. Макет установки (рис. 4) предназначен для регистрации изменения оптической плотности и коэффициента рассеивания исследуемого образца, находящегося в термостате при его охлаждении и регистрации изменения этих параметров во времени. Исследуемая проба в кювете подсвечивается источником света (лазером). Прошедший поток света регистрируется



**Рис. 2.** Динамика гидродинамического размера макромолекулярных изоформ из проб мочи здоровых лиц (без уролитиаза) при снижении температуры до 4°C.



**Рис. 3.** Динамика гидродинамического размера макромолекулярных изоформ из проб мочи пациентов с уролитиазом при снижении температуры до 4°C.

фотоприемниками. Микропроцессор измеряет сигнал с фотоприемников, управляет работой термостата и осуществляет обмен данными с компьютером. Программное обеспечение позволяет управлять макетом, регистрировать и сохранять данные эксперимента. Макет представляет собой электронно-оптический прибор, в состав которого входят следующие функциональные узлы: лазерный излучатель, фотоприемники, узел охлаждения на элементе Пельтье, термостат и микропроцессор.

Стандартизация исследования феномена М.Г. Залеского выполнена на моделях мочи с за-

данными характеристиками (рН, ионная сила, концентрация верифицированных изоформ уромодулина), что позволяет описать аналитические характеристики (чувствительность, специфичность) новой медицинской технологии для изучения диагностической эффективности скрининга оценки состояния коллоидного гомеостаза мочи, как критерия ренальных дисфункций.

Прибор измеряет оптическую плотность (поглощение света) и плотность мощности излучения, рассеиваемого образцом в кювете. Индикатриса рассеиваемого излучения зависит от кон-



**Рис. 4.** Макет анализатора «Уроскрин».

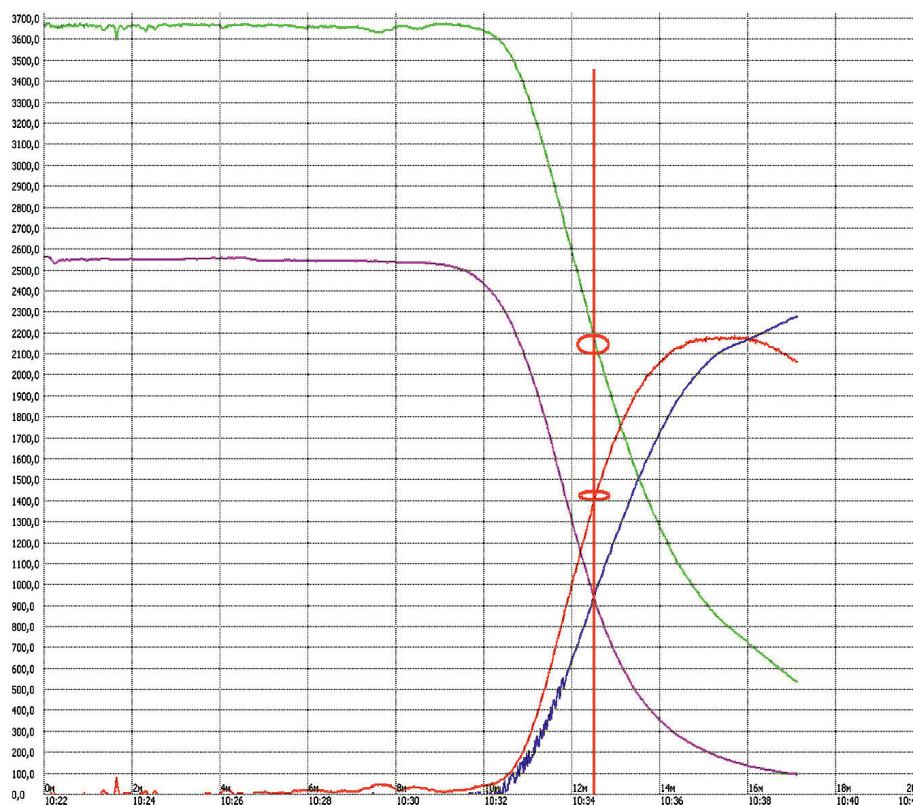


Рис. 5. График измерения интенсивности рассеяния света и оптической плотности проб мочи в анализаторе «Уроскрин».

центрации геля в кювете и размеров частиц: при малой концентрации максимум интенсивности расположен под углом около 45 градусов к оси излучения. При повышении концентрации (ОП более 0.4) максимум рассеивания находится под углом 65–85 градусов к оси излучения. Это справедливо для частиц размером около 1 мкм; если частицы имеют размеры 5–10 мкм, то основной максимум находится под углом 20 градусов и имеет узкую диаграмму направленности без провалов по оси излучения. Измерения значений производится каждую секунду и сохраняется в программе. На рис. 5 кривая 1 — график канала измерения оптической плотности, а кривая 2 — график измерения интенсивности рассеяния света. Время процесса (12 мин) отмечено вертикальной линией.

Апробация анализатора позволяет в дальнейшем использовать его для констатации эффекта фармакологической модификации процесса кристаллогенеза.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Уникальность уромодулина в стабилизации коллоида мочи заключается в том, что в широком диапазоне концентраций солей в части этого диапазона обеспечивается стабильность коллоида за

счет выраженных электроотрицательных свойств олигомерной формы уромодулина (7 МДа), а там, где емкость системы исчерпана и электроотрицательная форма уромодулина не способна предотвратить появление центров первичной кристаллизации насыщенного солями коллоида мочи, происходит переключение на иной механизм, в рамках действия которого олигомерная форма уромодулина (28 МДа) ингибирует рост образовавшихся микрокристаллов за счет увеличения вязкости коллоида. Для оценки вклада в вязкость коллоида мочи олигомерной формы уромодулина (28 МДа) можно использовать формулу для расчета характеристической вязкости  $\eta$ . В рассматриваемом случае вязкость определяется не столько общей длиной цепи, однозначно связанной с молекулярным весом олигомера, сколько эффективной длиной цепи в растворе. Только в случае предельно вытянутой цепи ее длина и молекулярный вес пропорциональны друг другу. Для определения молекулярного веса высокополимеров  $M$  по значению характеристической вязкости можно использовать следующую формулу:  $\eta = K \times M^\alpha$ , где  $K$  — коэффициент, постоянный для растворов данного полимергомологического ряда в данном растворителе,  $\alpha$  — величина, характеризующая

форм-фактор макромолекулы в растворе. Значение  $\alpha$  зависит от гибкости цепей и изменяется от 0.5 до 2.0. Из данного уравнения можно рассчитать прирост характеристической вязкости коллоида мочи при превращении олигомерной формы уромодулина (7 МДа). При постоянном  $K$  происходит увеличение молекулярной массы в четыре раза и изменение коэффициента  $\alpha$  от 1 до 2 (1 — для глобулярной формы 7 МДа, 2 — для палочкоподобной формы 28 МДа), в результате получаем увеличение вязкости в 16 раз. Очевидно, что данный расчет носит приблизительный и оценочный характер, однако, косвенно подтверждает предположение о возможном физиологическом значении наблюдаемых превращений олигомерных форм уромодулина (7 МДа — 28 МДа) в растворах с высокой концентрацией солей.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты нашего исследования не подтверждают распространенное мнение о том, что форма уромодулина (28 МДа) не характерна для нормы, а присутствует исключительно в моче пациентов с мочекаменной болезнью. В норме, в ряде случаев могут возникнуть условия (например, высокая концентрация солей, обезвоживание и длительные интервалы между мочеиспусканиями) при которых в моче можно наблюдать олигомерную форму уромодулина (28 МДа) у здоровых людей. Как правило, имеет место разнообразие олигомерных форм уромодулина и соотношение этих форм является отражением не только состояния здоровья конкретного человека, но и физико-химических свойств мочи в конкретный момент времени. Отличие между нормой и патологией заключается в соответствии свойств коллоида мочи и функциональной адекватности этим свойствам систем стабилизации, среди которых важную роль играет уромодулин.

Совокупность имеющихся литературных данных и результаты изучения белка Тамма—Хорсфалла позволяют выдвинуть следующие концептуальные положения:

1. Уромодулин — почечный эпителиальный гликопротеин, по существу, должен рассматриваться как протеом мочи, так как в большинстве своем иные белки имеют плазматическое происхождение или появляются в моче как следствие нарушения проницаемости клеточных мембран при поражении, прежде всего, канальцевого аппарата.

2. Уромодулин — мембранный белок, имеющий нетипичные физико-химические характеристики: гидродинамический размер, выраженный отрицательный заряд, что создает уникальную са-ногенетическую систему мочеотделения, характеризующую коллоидную устойчивость мочи, не-

обходимую для экскреции водонерастворимых кристаллоидов в условиях широкого размаха концентрации мочевых ингредиентов: pH, осмотической концентрации, ионов Na, K,  $\text{NH}_4$ .

3. Нарушения посттрасляционных процессов сиилирования уромодулина с экскрецией изоформ белка Тамма—Хорсфалла с уменьшенным поверхностным зарядом и измененной стереохимической структурой, приводят к полимеризации уромодулина с образованием макрочастиц более 400 нм, которые становятся центрами кристаллизации, инициирующих агрегацию водонерастворимых кристаллоидов (оксалаты, прежде всего) и развитию уролитиаза.

4. Деполимеризацию макрочастиц уромодулина в центрах кристаллизации можно рассматривать как перспективную технологию по метафилактике уролитиаза.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Проведенное исследование не имело спонсорской поддержки.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено без риска для здоровья людей с соблюдением всех принципов гуманности и этических норм (Хельсинкская декларация WMA, 2013 г.) при одобрении локального этического комитета и наличии информированного согласия пациентов на участие в исследованиях.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. К. Мартусевич, Дис. ... д-ра биол. наук (Кировская ГМА Минздрава России, М., 2013).
2. M. Carvalho, R. A. Mulinari, and Y. Nakagawa, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **35** (10) 1165 (2002).
3. С. Б. Ланда, В. В. Егоров, А. Б. Чухловин и др., *Клин.-лаб. конс.*, **6** (25), 33 (2008).
4. S. Youhanna, J. Weber, V. Beaujean, et al., *Nephrol. Dial. Transplant. J.*, **29** (1), 136(2014).
5. С.Б.Ланда, С. Х. Аль-Шукри, М. И. Горбачев и др., *Клин. лаб. диаг.*, **61** (6), 335(2016).
6. М. Г. Залеский, Патент № 2402769 РФ. Заявл. 27.04.09. Оpubл. 27.10.10. Зарегистр. 27.10.2010.
7. М. Г. Залеский, *Поликл. лаб. ЛПУ.*, **13**, 43 (2018)
8. С. Н. Шатохина и В. Н. Шабалин, *Урология и нефрология*, **1**, 23 (1998)
9. В. Л. Эмануэль и С. Б. Ланда, в сб. *Матер. XI межд. науч.-техн. конф. «Актуальные вопросы биологиче-*

- ской физики и химии» (Севастополь, 2016), т. 2, сс. 189–194.
10. С. Х. Аль-Шукри, Е. Т. Голощапов, М. И. Горбачев и др., Патент № 2504786 РФ. Заявл. 21.09.12, Опубл. 20.01.14, Бюл. №2. Зарегистр. 20.01.2014.
11. В. Л. Эмануэль, С. Б. Ланда, Ю. В. Эмануэль и др., *Лаборат. служба*, **6** (2), 27 (2017).
12. С. Б. Ланда, Н. А. Верлов, В. Л. Эмануэль и М. Р. Измайлов, в сб. *Матер. XII межд. науч.-техн. конф. «Актуальные вопросы биологической физики и химии»* (Севастополь, 2017), сс. 468–473.

## A Pathogenetic Role of Posttranslational Isoforms of Uromodulin

A.V. Iakovleva\*, N.A. Verlov\*\*, M.G. Zaleskiy\*, S.B. Landa\*, \*\*, V.V.Shapovalov\*\*\*, and V.L.Emanuel\*

\*Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, ul. L'va Tolstogo 6–8, St. Petersburg, 197022 Russia

\*\*Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov, National Research Centre «Kurchatov Institute», mkr. Orlova Roshcha 1, Gatchina, Leningradskaya oblast, 188300 Russia

\*\*\*Saint-Petersburg Electrotechnical University, ul. Professora Popova 5, St. Petersburg, 197376 Russia

Different biophysical techniques were used to study uromodulin isoforms using experimental models of urine formation (ionic composition, osmolality, pH) in the presence of intact uromodulin and its isoforms isolated from patients with urolithiasis. A model of a medical screening device for persons with preclinical urolithiasis was tested. The concept of targeted therapy of urolithiasis based on the modulation of the properties of uromodulin was put forth.

*Keywords: urolithiasis, uromodulin, Tamm-Horsfall protein, dynamic light scattering, pH, cations, osmolality, laboratory diagnostics*