

© С.Х.Аль-Шукри, М.И.Горбачев, Е.Т.Голощанов, 2013
УДК [616.613-003.7-002.193-07]:547.96

С.Х. Аль-Шукри¹, М.И. Горбачев¹, Е.Т. Голощанов¹

ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКА ТАММА–ХОРСФАЛЛА У БОЛЬНЫХ С БИЛАТЕРАЛЬНЫМ РЕЦИДИВИРУЮЩИМ НЕФРОЛИТИАЗОМ

S.H. Al-Shukri, M.I. Gorbachev, E.T. Goloschapov

THE VALUE OF STUDIES OF TAMM-HORSFALL PROTEIN IN PATIENTS WITH BILATERAL RECURRENT NEPHROLITHIASIS

1Кафедра урологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Определение концентрации и роли белка Тамма-Хорсфалла (БТХ) в патогенезе рецидивирующего нефролитиаза. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Обследованы 62 больных с билатеральным рецидивирующим нефролитиазом, 34 больных с односторонним нефролитиазом и 20 больных из группы контроля. БТХ выделяли из суточной мочи пациентов с помощью метода светодинамического рассеяния, который позволяет получать гистограммы распределения частиц по размерам в диапазоне от единиц нанометров до десятков микрон при сохранении нативных свойств субстратов. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Среднее значение длины частиц БТХ в контрольной группе составило $138,4 \pm 1,7$ нм. В группе с односторонним нефролитиазом средняя длина частиц БТХ составила $186,2 \pm 2,1$ нм. Средняя длина волны БТХ в группе больных с билатеральным нефролитиазом составила $1962,4 \pm 12,3$ нм. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Концентрация БТХ у лиц с билатеральным рецидивирующим нефролитиазом значительно выше, чем у больных в исследуемых группах, что может стать основой для разработки нового подхода к ранней диагностике уролитиаза, а также для разработки новых фармакологических методик профилактики камнеобразования.

Ключевые слова: белок Тамма-Хорсфалла (БТХ), рецидивирующий нефролитиаз, метафилактика камнеобразования.

ABSTRACT

THE AIM of the study was to determination of concentration and role of Tamm-Horsfall protein (THP) in the pathogenesis of recurrent nephrolithiasis. **PATIENTS AND METHODS.** The study included 62 patients with bilateral recurrent nephrolithiasis, 34 patients with unilateral nephrolithiasis and 20 patients in the control group. THP was isolated from the daily urine of patients with light dynamic scattering method, which produces a histogram of particle size distribution in the range from a few nanometers to tens of microns, while maintaining the properties of native substrates. **RESULTS.** The average value of THP particles length in control group was $138,4 \pm 1,7$ nm. In the group with unilateral nephrolithiasis mean THP particles length was $186.2 \pm 2, 1$ nm. Mean wavelength of THP in patients with bilateral nephrolithiasis was 1962.4 ± 12.3 nm. **CONCLUSION.** THP concentration in patients with bilateral recurrent nephrolithiasis is much higher than that of patients in study groups, which may be the basis for a new approach to the early diagnosis of urolithiasis, and development of new pharmacological methods of stone formation prevention.

Key words: Tamm-Horsfall protein (THP), recurrent nephrolithiasis, metaphylaxis stone formation.

ВВЕДЕНИЕ

Рост заболеваемости мочекаменной болезнью в последние годы отмечается во многих странах, в том числе и в России. Ученые всего мира прогнозируют дальнейшую тенденцию к росту нефролитиаза в связи с произошедшими существенными изменениями в образе жизни людей: увеличением числа неблагоприятных экологических и социальных факторов, характере питания, оказывающих как прямое, так и опосредованное действие на обменные процессы в организме человека. Актуальность проблемы

нефролитиаза обусловлена её социальной значимостью ввиду того, что в 65–70% случаях болезнь диагностируется у лиц в возрасте 20–55 лет, т.е. в наиболее трудоспособном периоде жизни.

По данным аутопсии, из 27133 исследований частота нефролитиаза составляет 6,0% [1]. Особенно тревожной остается ситуация с рецидивным камнеобразованием, которое имеет место у 42,0–50,0% [2, 3]. Нефролитиаз является одним из наиболее значимых, в медико-демографическом отношении заболеваний мочевой системы, в силу чего вопросы его распространенности и метафилактики постоянно занимают внимание клиницистов и организаторов здравоохранения. Как первичное, так и рецидивное

М.И. Горбачев. 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17
СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова, кафедра урологии. Тел. 8(812) 234-91-96, E-mail: mikko85@mail.ru

камнеобразование в мочевых путях следует отнести за счет недостаточного внимания в отношении проведения метаболических исследований, адекватной профилактики и метафилактики нефролитиаза.

Несмотря на широкое внедрение новых высокоэффективных, неинвазивных методов диагностики и лечения мочекаменной болезни, частота рецидива продолжает оставаться высокой – до 38,4% наблюдений [4]. Хорошо известно, что как бы эффективно ни была проведена операция по удалению камня, без последующей комплексной и индивидуально подобранной метафилактики конечный результат лечения будет неудовлетворительным.

В настоящее время одним из направлений метафилактики мочевого камнеобразования является изучение химического состава конкремента с последующим ограничением продуктов питания, содержащих наибольшее количество «камнеобразующих» веществ. При этом не учитывают состояние систем, обеспечивающих стабильность коллоидных свойств мочи. Одним из таких факторов, вызывающих кристаллогенез, может являться дефект продуцирования и активности белка Тамма-Хорсфалла (БТХ) – уромодулина [5], который ингибирует кристаллизацию оксалатов *in vitro*. Были отмечены различия в росте кристаллов оксалатов в присутствии БТХ и уромодулина [6, 7].

БТХ был впервые выделен из мочи в 1950 году [8]. Это гликопротеин с молекулярной массой 1,4 кД. Сам полипептид с молекулярной массой 85 кД состоит из 616 аминокислотных остатков, среди которых 48 молекул цистеина, образующих 24 дисульфидных мостика. Белок имеет 8 потенциальных сайтов N-гликозилирования, сосредоточенных в 4 доменах [6], диаметр гликозилированной макромолекулы составляет около 200 нм [5, 9, 10]. Изoeлектрическая точка чрезвычайно низкая ($pI = 3,21$), что связано не только с большим количеством остатков сиаловых кислот (около 5% по массе), но и с высоким содержанием карбоксилированных аминокислотных остатков в самом полипептиде.

Продуцируется БТХ в основном в дистальных канальцах нефрона в количестве 50–150 мг/сут, что определяет его низкую концентрацию в моче. При интоксикации, снижении почечного кровотока, в присутствии желчных кислот, при повышении осмолярности мочи, снижении pH мочи или повышении концентрации БТХ полимеризуется в линейные филаменты диаметром около 4 нм с резкими изгибами через каждые 10–14 нм. Молекулярная масса отдельных филаментов может достигать 70 кД. При повышении pH до 8,5 филаменты БТХ деградируют до состояния мономеров без потери

биохимических свойств. Дальнейшая полимеризация приводит к образованию «пучков» филаментов. Такие «пучки» служат основой для формирования гиалиновых цилиндров [11].

Отмечена противовоспалительная роль БТХ [5, 8], в частности, показано, что филаменты БТХ нейтрализуют вирусы гриппа [9]. Особое место отводится БТХ в процессе кристаллизации оксалатов и развитию мочекаменной болезни. E.R. Wenk и соавт. [9] показали, что нормальный БТХ ингибирует рост кристаллов оксалатов [12], а десилированный, наоборот, – ускоряет их образование. Десилирование снимает отрицательный заряд с поверхности молекул БТХ, что приводит к их агрегации. Эти комплексы служат центрами кристаллизации оксалатов. К этому же результату может приводить любое воздействие, вызывающее образование мегамолекулярных комплексов БТХ, в том числе и увеличение ионной силы. Поэтому образование мегамолекулярных комплексов БТХ в растворах с высокой ионной силой может служить маркером уролитиаза на самых ранних, доклинических, стадиях заболевания.

В урологической клинике СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова в 2009–2012 гг. изучали диагностическую и прогностическую роль БТХ у больных с билатеральным рецидивирующим нефролитиазом путем анализа состояния БТХ, его силирования и способности к образованию мегамолекулярных комплексов у больных с односторонним и билатеральным, рецидивирующим нефролитиазом. Учитывая системность нарушений у больных с билатеральным нефролитиазом, считаем необходимым выяснить различия в концентрации и структуре БТХ у больных с односторонним и билатеральным нефролитиазом. Это позволит сформулировать новый подход в понимании патогенеза мочевого камнеобразования и может дать дополнительные возможности его прогнозирования.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 62 пациента с билатеральным рецидивирующим нефролитиазом и 34 пациента с односторонними, впервые выявленными камнями почек обоего пола. Группу сравнения составили 20 пациентов, не имевших в анамнезе заболеваний почек и мочевыводящих путей от 25 до 60 лет. БТХ выделяли из суточной мочи пациентов с помощью метода светодинамического рассеяния, который позволяет получать гистограммы распределения частиц по размерам в диапазоне от единиц нанометров до десятков микрон при сохранении нативных свойств субстратов [7]. Метод основан на взаимодействии монохроматического

Сравнительная характеристика длины молекулы БТХ у больных с нефролитиазом и группы контроля ($\bar{X} \pm m$)

	Больные с нефролитиазом		Контрольная группа (n=20)
	Билатеральный (n=62)	Односторонний (n=34)	
Среднее значение длины БТХ, (нм)	1010,4±8,5 $p_2 < 0,0001$ $p_3 < 0,0001$	186,2±2,1 $p_1 < 0,0001$ $p_3 < 0,05$	138,4±1,7

Примечание. p_1 – при сравнении с билатеральным нефролитиазом; p_2 – при сравнении с односторонним нефролитиазом; p_3 – сравнение с контрольной группой.

когерентного излучения со светорассеивающими частицами исследуемой биологической жидкости. Информация обо всех динамических процессах в изучаемой системе содержится в спектре флуктуаций света, рассеянного на частицах в растворе. Спектр флуктуаций фототока на выходе фотоприемника совпадает со спектром рассеянного света и описывается кривой Лоренца (лоренцианом). Полуширина лоренциана прямо пропорциональна коэффициенту диффузии – D , который, в свою очередь, по формуле Эйнштейна–Стокса связан с гидродинамическим радиусом частиц – R_h . Таким образом, можно не только получить информацию о размерах частиц, присутствующих в исследуемом образце, но и следить за динамикой образования и распада макромолекулярных комплексов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе анализа результатов были получены данные о том, что из 20 пациентов группы контроля у 10 (50%) из них определялись частицы с $R_h=108,9 \pm 0,29$ нм. У 7(35%) пациентов – частицы с $R_h=54,6 \pm 5,83$ нм, а у 3(15%) пациентов той же группы – частицы с $R_h=251,6 \pm 17,09$ нм. Среднее значение длины частиц составило $138,4 \pm 1,7$ нм (таблица).

Из группы больных с билатеральным нефролитиазом (62) у 42 (66,6%) пациентов длина волны БТХ составила $1962,4 \pm 12,3$ нм, у 10 (16,6%) больных – $R_h=1010,4 \pm 9,2$ нм, у 7 (11,6%) пациентов $R_h=800,5 \pm 4$ нм, у 3(5%) больных – $269,9$ нм. Среднее значение длины частиц составило $1010,4 \pm 8,5$ нм. Из пациентов с односторонним нефролитиазом (34) у 16 (60%) пациентов $R_h=250,2 \pm 7,2$ нм, у 8 (10%) пациентов – $R_h=180,1 \pm 2,3$ нм, у 6 (17,5%) пациентов – $R_h=115,3 \pm 6,6$ нм, у 4 (12,5%) пациентов – $R_h=200,4 \pm 3,6$ нм. Среднее значение длины частиц составило $186,2 \pm 2,1$ нм (см. таблицу).

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные данные демонстрируют, что БТХ присутствует в моче лиц контрольной группы

со средними размерами $138,4 \pm 1,7$ нм. При увеличении ионной силы раствора десалирование снимает отрицательный заряд с поверхности молекул БТХ, что приводит к их агрегации и образованию мегамолекулярных комплексов БТХ со средними размерам $1010,4 \pm 8,5$ нм. Сформировавшиеся структуры служат центрами кристаллизации оксалатов, что приводит к развитию камнеобразования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные подтверждают наличие системных механизмов возникновения и развития рецидивирующего билатерального нефролитиаза, что позволяет рекомендовать определение образования мегамолекулярных комплексов БТХ в моче в качестве скрининга для выявления возможных рецидивов двустороннего камнеобразования. Следует считать, что увеличение ионной силы мегамолекулярных комплексов является ранним признаком нефролитиаза и в сочетании с другими методами диагностики позволяет разработать прицельную патогенетическую профилактику рецидивного камнеобразования.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Frequenz GH. Lokalisation und Begleiterkrankungen der Harn steine. Analyse von 1671 Urolithiasis – Obduktionen. *Z Urol Nephrol* 1990; 83 (9): 469-474
2. Pak CYC. Kidney Stone. *Lancet* 1998; 351: 1797-1801
3. Silva JAM, Guerra PG, Raggi P. et al. Stone recurrence rate and metaphylaxis in patients underwent extracorporeal shock wave lithotripsy. *10th Eur. Symp. on Urolithiasis* 2002; 279-281
4. Pack CY, Skurla C, Harvey J Graphic display of urinary risk factors for renal stone formation. *J Urol* 1985; 134 (5): 867-870
5. Shiraga H, Min W, Vandusen WJ. et al. Inhibition of calcium oxalate crystal growth in uropontin: Another member of the aspartic acid-rich superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 421
6. Carvalho M, Mulinari RA, Nakagawa Y. Role of Tamm-Horsfall protein and uromodulin in calcium oxalate crystallization. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2002; 35: 1165-1172
7. Tamm I, Horsfall FL. Characterisation and separation inhibitor of viral hemagglutination present in urine. *Proc Biol Med* 1950; 74: 108-114
8. Ланда СБ, Егоров ВВ, Чухловин АБ, Эмануэль ЮВ. Применение метода динамического светорассеяния для исследования обратимых мегамолекулярных комплексов белка Тамма-Хорсфалла и их роли в ранней диагностике уролитиаза. *Клинико-лабораторный консилиум* 2008; 6 (25): 33-39
9. Wenk RE, Bhagavan BS, Rudert J. Tamm-Horsfall uromucoprotein and the pathogenesis of casts, reflux nephropathy, and nephritides. *Pathobiol Annu* 1981; 11: 229-257
10. Гликин АЭ. Полиминерально-метасоматический кристаллогенез. СПб., Нева, 2004. 320 с
11. Rosenfeld R, Bangio H, Gerwig GJ et al. Alectin array-based methodology for the analysis of protein. *J Biochem Biophys Methods* 2007; 70: 415
12. Knorle R, Schnierle P, Koch A. et al. Tamm-Horsfall glycoprotein: role in inhibition and promotion of renal calcium oxalate stone formation studied with Fourier-transform infrared spectroscopy. *Clin Chem* 1994; 40 (9): 1739-1743

Поступила в редакцию 22.01.2013 г.
Принята в печать 27.03.2013 г.