

© Я.Ф.Зверев, А.Ю.Жариков, В.М.Брюханов, В.В.Лампатов, 2010
УДК 616.63-003.7:621.376]:532.781

Я.Ф. Зверев¹, А.Ю. Жариков¹, В.М. Брюханов¹, В.В. Лампатов¹

МОДУЛЯТОРЫ ОКСАЛАТНОГО НЕФРОЛИТИАЗА. ИНГИБИТОРЫ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ

Ya.F. Zverev, A.Yu. Zharikov, V.M. Brukhanov, V.V. Lampatov

MODULATORS OF OXALATE NEPHROLITHIASIS. INHIBITORS' CRYSTALLIZATION

¹Кафедра фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул, Россия

РЕФЕРАТ

Обзор литературы посвящен описанию факторов, препятствующих нуклеации, агрегации и росту кристаллов оксалата кальция. Основными белковыми макромолекулами, ингибирующими образование почечных камней, являются протеин Тамма-Хорсфалла, остеопонтин, бикунин и фрагмент 1 протромбина. В обзоре анализируются особенности структуры и функции данных гликопротеинов, обсуждаются их вероятные механизмы действия и роль в патогенезе мочекаменной болезни.

Ключевые слова: оксалатный нефролитиаз, ингибиторы кристаллизации.

ABSTRACT

Review of the literature focuses on barriers to nucleation, aggregation-navigation and the growth of crystals of calcium oxalate. Main proteins, inhibiting the formation of kidney stones, are protein Tamm-Horsfalla, osteopontin, bikunin and prothrombin fragment 1. In particular, we analyze the structure and function of these glycoproteins, discusses their likely mechanism of action and role in the pathogenesis of urolithiasis.

Key words: oxalate nephrolithiasis, inhibitors of crystallization.

Как известно, нормальная моча человека пересыщена солями и, в первую очередь, оксалатом и фосфатом кальция, способными индуцировать образование почечных камней [1]. Это адаптационный процесс, являющийся следствием гомеостатического сохранения воды в организме. Однако далеко не у всех людей возникает склонность к развитию нефролитиаза. По всей видимости, это в значительной степени обусловлено наличием в моче белковых макромолекул (в основном – гликопротеинов), препятствующих кристаллизации. Многие исследования показали, что нарушение функции этих ингибиторов кристаллизации следует рассматривать как один из пусковых факторов развития нефролитиаза [2, 3]. Поэтому вполне вероятно, что у людей, склонных к образованию почечных камней, имеются определенные количественные или качественные изменения структуры и/или функции этих макромолекул. И действительно, давно показано, что при добавлении ионов оксалата и кальция к моче пациентов с оксалатным нефролитиазом процесс кристаллизации происходит более активно, чем в моче здоровых людей, а

добавление нормальной мочи в значительной степени ингибирует адгезию кристаллов оксалата кальция к культивируемым почечным клеткам [4, 5].

Данный обзор литературы посвящен роли основных белковых макромолекул, ингибирующих кристаллизацию оксалата кальция, к которым относятся протеин Тамма–Хорсфалла (ТНП), остеопонтин (ОПН), бикунин и фрагмент 1 мочевого протромбина.

Протеин Тамма–Хорсфалла

История изучения протеина Тамма–Хорсфалла (в оригинальной транскрипции Tamm–Horsfall protein, ТНП) берет начало с 1950 г., когда американские исследователи I.Tamm и F.L.Horsfall выделили из человеческой мочи мукопротеин, обладающий способностью ингибировать гемагглютинацию вирусов [6]. Оказалось, что этот протеин принимает участие во многих патологических процессах в почках, в том числе играет важную роль в патогенезе нефролитиаза [7, 8]. На протяжении всех этих десятилетий перед научным сообществом стоит вопрос: в чем же в действительности заключается эта роль? К сожалению, однозначно и исчерпывающего ответа по-прежнему нет. Одни авторы считают, что ТНП защищает почеч-

Зверев Я.Ф. Алтайский медицинский университет. 656038, г.Барнаул, пр.Ленина, 40, тел. (3852) 26-08-35, zverf@asmu.ru

ные каналы от адгезии кристаллов, другие – приводят экспериментальные доказательства обратного, т.е. позиционируют ТХП в качестве стимулятора камнеобразования. Как часто бывает, истина, по всей видимости, находится где-то на стыке обеих точек зрения. Поэтому мы попытаемся хотя бы отчасти прояснить роль протеина Тамма–Хорсфалла в патогенезе мочекаменной болезни.

Сведения о структуре ТХП начали появляться уже вскоре после его открытия. В 1952 г. было установлено, что он в высокой степени гликозилирован. Количество гликозилированных группировок составляет примерно 30% от общего содержания углеводов в молекуле ТХП [9]. Выяснено, что ТХП является самым обильным гликопротеином мочи здоровых людей, а его молекулярная масса составляет примерно 90 kDa [10]. Хроматографическое разделение гликопептидов, входящих в структуру ТХП, и их дальнейшее изучение при помощи спектроскопии показало, что они относятся к N-гликозильному и N-ацетиллактозаминному типам [11]. Важное событие в понимании структуры ТХП произошло в 1985 г., когда A.V.Muchmore и J.M.Decker выделили из мочи беременных женщин гликопротеин массой 85 kDa, получивший название «уромодулин» [12]. Дальнейшее исследование первичной структуры этого белка показало, что она гомологична структуре ТХП. Именно поэтому в ряде публикаций ТХП и уромодулин упоминаются как тождественные понятия. Возможно, это не совсем верно, поскольку показано, что указанные вещества по-разному фосфорилируются, а это предопределяет некоторые особенности их функционирования [13]. Не вдаваясь в подробности этой дискуссии, отметим, что открытие уромодулина позволило значительно точнее идентифицировать структуру ТХП. Установлено, что белковая часть гликопротеина состоит из 616 аминокислот, включая 48 цистеиновых последовательностей, вовлеченных в построение 24 дисульфидных мостиков, важных для конформации белка. Выявлено наличие 8 участков N-гликозилирования, объясняющих высокое содержание углеводов в молекуле ТХП [12]. Кроме того, уромодулин содержит 4 домена эпидермального фактора роста, включающих кальций-связывающие последовательности, которые, по-видимому, определяют процесс взаимодействия с другими белками [14]. Отличительной структурной особенностью ТХП является наличие так называемого домена *Zona Pellucida* [15]. Известно, что *Zona Pellucida* – это белковая часть оболочки яйцеклетки, обеспечивающая взаимодействие со сперматозоидами [16]. Наличие в структуре ТХП *Zona Pellucida* позволяет предположить

существование регуляторной связи между ним и эстрогенами, что подтверждается некоторыми экспериментальными данными [17].

Изучение локализации протеина Тамма–Хорсфалла в организме первоначально показало, что соответствующая мРНК экспрессирована только в почках [18], хотя были проведены попытки выявить экспрессию ТХП и в других тканях. Так что сегодня с определенностью можно говорить лишь о почечной локализации ТХП. Установлено, что ТХП в нефроне присутствует в основном в клетках толстого восходящего отдела петли Генле, включая сегмент выше плотного пятна, переходящий в начальные отделы дистальных канальцев [19, 20]. Внутриклеточный транспорт ТХП можно представить следующим образом: ТХП образуется из прекурсоров, депонирующихся в эндоплазматическом ретикулуме. При этом установлено, что для выхода в цитоплазму принципиально важно образование правильной сети дисульфидных мостиков [21]. После этого протеин транспортируется в комплекс Гольджи, где завершается процесс образования гликанов, а затем перемещается к люминальной поверхности клетки. К поверхности клеток ТХП прикрепляется с помощью фосфатидилинозитольного якоря [15]. Конечным этапом высвобождения является расщепление фосфатидилинозитольной группы специфической фосфолипазой, что приводит к отсоединению ТХП от мембраны и накоплению его в моче [14].

Процесс синтеза ТХП находится под контролем специфического гена (*UMOD*). Установлено, что этот ген локализуется на хромосоме 16p [22]. Проблема регуляции образования и экскреции ТХП довольно сложна. В разных опытах статистический разброс экскреции ТХП весьма высок – от 5 до 600 мг/сут [23–26]. Было предложено несколько объяснений наблюдаемых различий. Во-первых, на точность результатов оказывает влияние различие методических подходов. Во-вторых, ключевым фактором для определения ТХП в моче является степень дизагрегации его молекулы, максимальная величина которой проявляется в щелочной среде. В этих условиях резко увеличивается количество участков взаимодействия со специфическими антителами, используемыми в анализе [23, 26]. Однако в некоторых ситуациях, например, при сдвиге pH в кислую сторону у больных нефролитазом, усиливается агрегация молекул ТХП [23, 24]. В результате активируется флокуляция и увеличивается адгезия молекул на клетках уротелия, что приводит к уменьшению выделения с мочой детектируемого ТХП [23, 27, 28]. Таким образом, можно обозначить pH

как первый важнейший фактор регуляции экскреции ТХП.

Кроме того, было установлено, что уровень почечной экскреции ТХП напрямую зависит от скорости клубочковой фильтрации. Выяснилось, что величина ТНР/Сг (отношение ТХП к креатинину) подвержена гендерным колебаниям. Так, у здоровых женщин показатель ТНР/Сг был значительно больше, чем у женщин, страдающих МКБ, равно как у здоровых и больных мужчин [23, 25]. Кроме того, была показана корреляция суточной экскрецией ТХП с параметрами тела человека [23]. Авторы последнего исследования отметили, что у здоровых женщин продуцируется гораздо больше ТХП относительно параметров тела и показателей функции почек, чем у здоровых мужчин и больных с МКБ. Нам представляется, что этому факту можно найти вполне логичное объяснение. Как уже отмечалось [14], очень близкую структуру с ТХП имеет белок уромодулин, выделяемый с мочой беременных женщин. Возможно, повышенная продукция ТХП у женщин является эволюционно сформировавшимся защитным механизмом, направленным на предотвращение камнеобразования в условиях мощной нагрузки нефрона кальцием, что наблюдается во время беременности. Таким образом, количество ТХП, выделяемого с мочой, напрямую зависит от функционального состояния почек, параметров тела и половой принадлежности.

Большой интерес представляют возможные регуляторные функции ТХП, вытекающие из его локализации. Напомним, что указанный гликопротеин располагается преимущественно в клетках толстого восходящего отдела петли Генле. Поэтому возникли предположения относительно возможных взаимодействий ТХП с локализованными здесь транспортными системами. И действительно, имеются экспериментальные данные, подтверждающие эти предположения. Установлено, например, что антенатальная форма синдрома Бартера сопровождается абсолютным дефицитом содержания ТХП как внутри клеток, так и в моче [29, 30]. Как известно, синдром Бартера развивается в результате мутации Na^+ , K^+2Cl^- -котранспортера (НКСС), располагающегося на люминальной мембране клеток толстого восходящего отдела петли Генле [31]. Учитывая это, можно предположить, что между транспортером НКСС и ТХП существуют определенные, скорее всего, реципрокные взаимоотношения. Это предположение подтверждается экспериментальными данными. Оказалось, что введение крысам петлевого диуретика фуросемида, который, как известно, блокирует данный симпортер, сопровождается существенным увели-

чением мРНК ТХП [32, 33]. С другой стороны – опыты показали, что при недостатке ТХП существенно увеличивается продукция мРНК целого ряда различных почечных транспортеров. Кроме того, было обнаружено, что при недостатке ТХП снижается клубочковая фильтрация. При этом ТХП-дефицитные мыши не могли концентрировать мочу в нормальной степени, что сопровождалось усилением диуреза, но без существенного увеличения экскреции электролитов [34]. Таким образом, было установлено, что между уровнем продукции ТХП и активностью почечных транспортеров существует определенная связь. Другими исследователями было подтверждено наличие обратного пропорционального зависимости между уровнем экспрессии НКСС2 и количеством ТХП у крыс [35, 36]. С современных позиций эту зависимость можно объяснить следующим образом. Установлено, что котранспортер НКСС2 и ТХП совместно локализируются на так называемых детергент-устойчивых доменах клеточной мембраны. При этом оба они вовлечены в трансмембранный трафик и взаимодействуют друг с другом, а значит, при изменении количества одного может меняться и количество другого [34, 37, 38]. Справедливости ради отметим, что в проблеме взаимодействия ТХП с почечными транспортерами достаточно много пока не ясных моментов. Представляют также интерес взаимоотношения ТХП и антидиуретического гормона (АДГ). Установлено, что снижение синтеза ТХП влечет за собой увеличение активности вазопрессина, и наоборот, активация АДГ сопровождается ослаблением синтеза ТХП [33, 36, 38]. Нельзя, правда, исключать, что уменьшение количества ТХП на фоне вазопрессина может являться лишь следствием стимулирующего влияния последнего на экспрессию котранспортера НКСС [38].

Впервые интерес к ТХП как к молекуле, участвующей в развитии мочекаменной болезни, возник в начале 1970-х годов, когда было обнаружено, что этот гликопротеин в большом количестве присутствует в оксалатных камнях [39, 40]. При этом оказалось, что характер данного присутствия имеет важные отличительные особенности. Во-первых, ТХП является самым представительным компонентом органической матрицы почечных камней [41]. Во-вторых, как известно, с кальциевыми кристаллами в почках могут взаимодействовать макромолекулы, имеющие достаточно большой отрицательный заряд. Чаще всего эти макромолекулы необратимо инкорпорируются в кристалл, становясь частью его органической матрицы [42]. Однако, как показали эксперименты, ТХП далеко не

всегда можно обнаружить в пределах кристалла оксалата кальция [43]. Данное наблюдение указывает на то, что взаимодействие ТХП с кристаллом не является строго необратимым. В любом случае, факт присутствия молекулы ТХП в почечных камнях может трактоваться двояко: это может свидетельствовать как о его стимулирующей, так и о его ингибирующей роли в патогенезе камнеобразования.

В настоящее время значительная часть проводимых экспериментов показывает, что ТХП является одним из важнейших ингибиторов камнеобразования. Во-первых, ингибирующую способность нормального ТХП (уточнение «нормальный» имеет важное значение, смысл которого будет раскрыт ниже) достаточно наглядно демонстрируют опыты по изучению процессов кристаллизации *in vitro*. Одна из методик базируется на спектрофотометрическом измерении оптической плотности раствора, получающегося при смешивании растворов хлорида кальция и оксалата натрия [44]. Как показывают эксперименты, нормальный ТХП в концентрации порядка 30–40 мг/л ингибирует нуклеацию и особенно (на 76–81%) – агрегацию кристаллов кальция оксалата моногидрата, не уступая по эффективности цитрату [28, 45]. Второй методический подход, касающийся изучения динамики преципитации кристаллов кальция оксалата моногидрата на клеточной культуре МДСК, показал, что ТХП в значительной степени блокирует их адгезию [5]. Аналогичные данные были получены и при исследовании свойств ТХП, выделенного из мочи здоровых людей [46]. Более того, был установлен механизм, с помощью которого ТХП ингибирует нуклеацию и агрегацию кристаллов СаОх. Имея большой отрицательный поверхностный заряд, он взаимодействует с положительно заряженными частями кристаллов, создавая своеобразное покрывало. В результате такие кристаллы не способны прикрепляться к клеткам почечной ткани и выводятся с мочой [5, 46]. Подтверждение этих результатов было получено и в экспериментах *in vivo*. Так, ТХП-нокаутные мыши не могли противостоять камнеобразованию на фоне этиленгликолевого нефролитиаза [47].

Переходя к клиническим наблюдениям, отметим, что еще в 1981 г. впервые был зафиксирован факт снижения экскреции ТХП при нефролитиазе [48]. Похожие исследования были проведены спустя 13 лет в медицинском центре Нового Орлеана (США). В экспериментах были задействованы 53 пациента с оксалатным нефролитиазом и 22 здоровых добровольца. Оказалось, что у больных за сутки экскретировалось с мочой значительно мень-

ше ТХП и пропорционально снижалась способность мочи предотвращать агрегацию кристаллов кальция оксалата [49]. В другой работе подтвердилось, что почечная экскреция ТХП у здоровых людей превышает таковую у больных МКБ [50]. Подчеркнем, однако, одну важную деталь – практически ни в одном исследовании не выявлено существенных различий в абсолютных цифрах экскреции ТХП у больных и здоровых людей. Дифференциация проявлялась только тогда, когда показатели выделения ТХП с мочой соотносились с экскрецией креатинина. С одной стороны, данное наблюдение еще раз подтверждает факт зависимости экскреции ТХП от функционального состояния нефрона, как это уже отмечалось выше [23]. Но, с другой стороны – показывает, что в условиях нефролитиаза не наблюдается количественных изменений почечной экскреции ТХП. Фиксируемые относительные изменения, по-видимому, являются лишь следствием изменений функции почек. Почему же тогда ингибирующая способность мочи в отношении камнеобразования в условиях нефролитиаза существенно снижается? Логично было предположить, что причина утраты протеином Тамма–Хорсфалла своих ингибирующих свойств может заключаться не в количественных, а в качественных изменениях его структуры. Подтверждения этой идеи появились в начале 1990-х годов [51]. А впервые серьезные доказательства этого были получены в 1994 г.

Группа немецких и швейцарских ученых провела исследование структурных различий ТХП, выделенного из мочи 12 здоровых добровольцев и 11 людей с подтвержденным диагнозом «нефролитиаз». Оказалось, что нормальный ТХП (нТХП) имеет гораздо более высокую степень сиализации, чем патологический ТХП (пТХП). Количество сиаловой кислоты в нТХП равнялось 51 ± 9 г/кг, тогда как пТХП содержал лишь 21 ± 4 г/кг данного субстрата [41]. Учитывая, что других структурных различий выявлено не было, возникло предположение, что именно уменьшение степени сиализации является причиной того, что пТХП теряет свои ингибирующие свойства и даже становится стимулятором камнеобразования. Параллельно в Нидерландах были идентифицированы различия величин поверхностного заряда и размеров молекул нТХП и пТХП [52]. Было установлено, что пТХП может подвергаться флокуляции и образовывать большие гелеподобные частицы. Эти частицы, осевшие на клетках уротелия, выступают в качестве нуклеатора кристаллизации и, более того, действуя подобно клею, создают «ловушку» для протекающих по каналцу кристаллов, стимулируя их

агрегацию [27, 45]. Описанные результаты подтвердились в экспериментах *in vitro*. В любых концентрациях пТХП стимулировал агрегацию кристаллов оксалата кальция [45].

Таким образом, в утрате протеином Тамма–Хорсфалла своих ингибирующих свойств решающее значение имеет модифицирование его молекулы. Точные причины этого модифицирования остаются неизвестными. Возможно, пТХП образуется вследствие дефекта ферментов, участвующих в процессе синтеза олигосахаридных цепей. Это может происходить, например, при хронической алкогольной интоксикации, когда существенно возрастает количество асиалотрансферин-гликоформ [53]. Кроме того, некоторые врожденные заболевания сопровождаются генетически обусловленными нарушениями функционирования гликозидаз и гликозилтрансфераз, что может свидетельствовать о важном значении наследственности в патогенезе мочекаменной болезни [54]. Весьма интересными представляются данные, демонстрирующие роль оксидативного стресса в модификации ТХП [55]. От себя добавим еще одно предположение: не исключено, что определенное значение в образовании пТХП могут иметь вирусные инфекции. Широко известно, что многие вирусы используют в процессе репродукции фермент нейраминидазу. Вполне возможно, в результате вирусной «атаки» на почки ТХП, обладающий способностью ингибировать геммагглютинацию вирусов [6], нейтрализует нейраминидазу, но сам при этом теряет часть сиаловой кислоты, трансформируясь в пТХП.

Протеин Тамма–Хорсфалла является одним из основных ингибиторов камнеобразования. По-видимому, механизм его действия заключается в создании вокруг кристаллов оксалата кальция защитного «покрывала», предотвращающего их адгезию к клеткам уротелия. Однако в некоторых патологических условиях происходит модификация ТХП, приводящая к утрате значительной части сиаловой кислоты. Как следствие, ТХП не способен проявлять ингибирующие свойства и даже может становиться стимулятором камнеобразования, что, возможно, является одним из пусковых механизмов развития нефролитиаза.

Остеопонтин

Остеопонтин (OPN), мультифункциональный фосфорилированный гликопротеин, впервые был выделен из костного матрикса быка в 1985 г. шведскими исследователями А. Franzen и D. Heinegard из отделения физиологической химии университета Лунда [56]. Вскоре этими же авторами была установлена первичная структура полученного сиалопротеина, который получил название «остеопон-

тин». Предложенное название подразумевает, что протеин является продуктом клеток костного матрикса и что он образует в матриксе мостики (от латинского «pons») между клетками и минералами [57]. За истекшие почти два с половиной десятилетия опубликовано более 1000 работ, посвященных этому гликопротеину, однако его роль в организме выяснена далеко не до конца.

Остеопонтин (OPN) представляет собой отрицательно заряженный кислый фосфорилированный гликопротеин, который состоит приблизительно из 300 аминокислот с очень высоким содержанием остатков аспарагиновой (48) и глутаминовой (27) аминокислот. Важной особенностью строения OPN является наличие интегрин-связывающей последовательности RGD (Arg-Glu-Asp). Кроме того, установлено, что OPN является лигандом некоторых вариантов рецептора CD44. Аминокислотная последовательность OPN содержит также 42 сериновых и 14 треониновых остатков [57–66]. Молекулярная масса изоформ OPN колеблется в зависимости от степени посттрансляционных модификаций протеина от 40 до 70 kDa [67].

Выяснилось, что остеопонтин продуцируется не только костной тканью, но и многими другими органами, включая почку, легкие, печень, мочевой пузырь, поджелудочную и молочную железы [68, 69]. Экспрессия протеина была также продемонстрирована *in vitro* и *in vivo* в клетках гладкой мускулатуры и в макрофагах [70–72], а присутствие OPN было выявлено в таких биологических жидкостях организма, как кровь, моча, молоко, жидкость внутреннего уха [64, 73–75]. Более того, в зависимости от цели исследования и локализации экспрессии один и тот же гликопротеин встречается под различными названиями: «крысиный костный сиалопротеин I» [57], «2 ar» [76], «Eta-1» [77], «уропонтин» [78], «протеин мочевого камня» [79]. Все это указывает на полифункциональность описываемого протеина [80, 81]. И действительно, оказалось, что остеопонтин играет важную роль в регуляции целого ряда физиологических и патологических процессов. Получены неопровержимые свидетельства участия OPN в модулировании воспаления, репарации, нейропротекции, туморогенеза, хемотаксиса и апоптоза [64, 82–91].

Но важнейшее значение, без сомнения, имеет участие остеопонтина в процессе биоминерализации. В норме биоминерализация является тонко регулируемым физиологическим процессом и ограничена у млекопитающих костной и зубной тканью. Показано, что в ходе нормальной минерализации костей OPN обеспечивает дифференцировку и рекрутирование остеокластов, а также

ингибирует образование и развитие гидроксиапатита [92–95]. Кроме того, имеются свидетельства вовлечения OPN в процесс костной резорбции. Так, нокаутные мыши, лишенные OPN, в значительной мере защищены от потери костной ткани, индуцированной овариэктомией [96].

Участие остеопонтинина в процессе биоминерализации подтверждается и тем, что экспрессия протеина в значительной степени зависит от уровня гормонов, регулирующих содержание кальция в организме [97–101].

Особую роль играет участие остеопонтинина в ходе патологической минерализации. Этот процесс, называемый эктопической, внескелетной или дистрофической кальцификацией, подразумевает отложение кальциевых солей в мягких тканях с развитием впоследствии целого ряда нежелательных эффектов. При определенных патологических условиях в результате повреждения, возраста, метаболического дисбаланса эктопической кальцификации могут подвергаться кровеносные сосуды, сердечные клапаны и почка. Эктопическая кальцификация часто выявляется у лиц с атеросклерозом, сахарным диабетом, терминальной стадией почечной болезни и, как правило, определяет неблагоприятный исход заболевания [102–106]. При этом у больных с дистрофической кальцификацией очень часто обнаруживается резко повышенная экспрессия остеопонтинина [107–111]. Эти наблюдения указывают на возможную ингибирующую роль остеопонтинина в отношении эктопической кальцификации. Высказанное предположение нашло подтверждение в экспериментах *in vitro* с использованием модели кальцификации клеток гладкой мускулатуры сосудов, в которых OPN подавлял указанный процесс [112].

Первые данные о почечной экспрессии остеопонтинина были получены на почках грызунов. При этом OPN был идентифицирован в почках мышей и крыс как в норме [76, 113–115], так и в условиях почечной патологии [116–119]. Отметим, что в большинстве экспериментов наибольшая экспрессия остеопонтинина выявлялась в эпителии петли Генле, дистальных канальцев, собирательных трубок и папиллярной поверхности [79, 114, 117, 120, 121]. В первых исследованиях, посвященных изучению почки человека, локализация мРНК соответствующего протеина была определена в дистальных канальцах, собирательных трубках и в эпителии почечной лоханки. В фундаментальном исследовании с использованием современных методических подходов проанализировали экспрессию мРНК и протеина OPN в различных отделах фетальной и зрелой почек человека [122]. Оказа-

лось, что почечная экспрессия остеопонтинина проявляется, начиная с 75–80-го дня внутриутробного развития, растет с увеличением срока беременности и сохраняется на высоком уровне в зрелом возрасте. В нормальной зрелой почке человека OPN локализован преимущественно в дистальных отделах нефрона, в наибольшей степени – в восходящем отделе петли Генле. В случаях проявления фокального интерстициального фиброза, сочетающегося с накоплением макрофагов в интерстиции, экспрессия OPN была значительно усилена во всех сегментах нефрона, включая проксимальные канальцы [122].

Сегодня господствует точка зрения, согласно которой основная роль почечного остеопонтинина состоит в предотвращении образования камней почек, состоящих преимущественно из оксалата кальция и гидроксиапатита. Такой эффект четко продемонстрирован в экспериментах *in vitro*. В опытах с использованием различных клеточных модельных систем показано, что остеопонтинин ингибировал нуклеацию, агрегацию и рост кристаллов оксалата кальция [78, 123–127]. Так, было зафиксировано 50% ингибирование агрегации кристаллов CaOx при добавлении 28 ± 4 нмоль/л мочевого остеопонтинина, а 50% подавление роста кристаллов происходило при использовании уже 16 ± 2 нмоль/л. При этом указанные концентрации OPN были значительно ниже тех, которые определяются в нормальной моче [128]. Одновременно было установлено, что описываемый гликопротеин прямо ингибирует связывание кристаллов CaOx с культивируемыми клетками почечного эпителия, а экспозиция почечных клеток с кристаллами кальция оксалата моногидрата стимулирует продукцию OPN [129, 130].

Полученные *in vitro* результаты нашли свое подтверждение в экспериментах *in vivo*. Косвенные данные, указывающие на возможную ингибирующую роль остеопонтинина, были получены на моделях нефролитиаза у крыс. У этих животных отложение кристаллов оксалата кальция происходило параллельно с повышением экспрессии протеина OPN и его мРНК. Причем повышенная экспрессия регистрировалась именно в тех отделах нефрона, где происходил процесс кристаллизации [131–134]. Наиболее убедительные свидетельства *in vivo* получены в экспериментах на нокаутных животных. Так, у мышей с делецией гена OPN на фоне приема этиленгликоля наблюдали образование кальций-оксалатных камней, в то время как у обычных мышей этого не происходило [135–137]. При этом у нормальных мышей развитие гипероксалатурии сочеталась с увеличением в 2–4 раза по-

чечной экскреции остеопонтин. Полученные результаты позволили цитируемым авторам сделать вывод о том, что остеопонтин играет ключевую ренопротективную роль *in vivo* в качестве ингибитора образования кристаллов СаОх. Подобным образом в другом исследовании 10% мышей, лишенных OPN, спонтанно образовывали почечные камни, а в условиях индуцированной гипероксалурии число таких животных возрастало до 65% [138].

Роль остеопонтин в патогенезе мочекаменной болезни у человека в силу отсутствия адекватных методик выяснена недостаточно. И все же отметим два важных момента в пользу ингибирующего воздействия OPN на образование почечных камней. Первый: в ряде клинических исследований показано значительное снижение содержания остеопонтин в моче пациентов, страдающих МКБ, в сравнении со здоровыми людьми [139–142]. Справедливости ради отметим, что не во всех исследованиях были зарегистрированы подобные различия [143–145]. Второй важный момент состоит в наличии единичных мутаций гена OPN, которые обнаружены у значительно большего числа пациентов с нефролитиазом по сравнению с лицами без МКБ [146, 147]. Таким образом, в целом можно считать установленным, что остеопонтин играет ингибирующую роль в процессе кристаллизации солей оксалата кальция и препятствует образованию почечных камней.

Анализируя особенности строения остеопонтин, очевидно, что его молекула содержит ряд доменов, определяющих мультифункциональность этого гликопротеина. С одной стороны – это уже упоминавшаяся аминокислотная последовательность RGD (Arg-Gly-Asp), обеспечивающая его активное интегрин-зависимое связывание с клетками. Этому же способствует связывание через мотив SVVYGLR, а также взаимодействие с известным рецептором CD44, чувствительным к гиалуронану [65, 136, 148]. С другой стороны – OPN имеет достаточно возможностей для связывания с поступающими в мочу ионами кальция, что обуславливает нарушение нуклеации, агрегации и роста кальциевых кристаллов. Способность остеопонтин связывать кальций обеспечивается целым рядом причин. Во-первых, наличием большого количества электроотрицательных аминокислотных остатков, в первую очередь – аспарагиновой и глутаминовой кислот. Так, на 50 остатков аспарагиновой кислоты, собранных в кластеры вблизи N-терминального конца, приходится от 20 до 25% величины молекулы OPN. Между тем, установлено, что протеины, богатые аспарагиновой кислотой, тесно связаны с процессом минерализации во

многих органах и тканях [78, 149]. Так что высоко насыщенные анионами участки молекулы OPN, составленные из остатков кислых аминокислот, по-видимому, определяют потенциальные места связывания Са²⁺. Эти анионные регионы дают возможность остеопонтину образовывать растворимые комплексы с ионами Са²⁺ и посредством этого ингибировать отложение и кристаллизацию кальциевых солей [67]. И действительно, добавление аспарагиновой кислоты в экспериментах *in vitro* сопоставимо с OPN подавляло рост кристаллов кальция оксалата моногидрата и гидроксиапатита [150, 151]. Относительно роли глутаминовой кислоты существует мнение, что ее присутствие в молекуле остеопонтин определяет, скорее, изменение величины и формы образующихся кристаллов [152, 153].

Вторым моментом, определяющим активность остеопонтин вообще и его способность связывать ионы Са²⁺ в частности, является степень фосфорилирования молекулы этого гликопротеина. Здесь уместно привести ряд наблюдений, не укладывающихся в общую концепцию остеопонтин как ингибитора кристаллизации. В цикле работ японских исследователей из университета Осаки остеопонтин позиционируется как промоутер кристаллизации и формирования кальций-оксалатных почечных камней [154]. В экспериментах *in vitro* был продемонстрирован повышенный аффинитет кристаллов СаОх к эпителию клеточной линии дистальных почечных канальцев (почки собак Madin-Darby, MDCK), когда они инкубировались с остеопонтином [155, 156], и получены косвенные свидетельства повышенной адгезии кристаллов оксалата кальция на канальцевых клетках [157]. Кроме того, в этой же лаборатории было установлено, что ингибирование синтеза OPN подавляло осаждение и агрегацию кристаллов СаОх на почечных клетках крыс, как и добавление поликлональных антител к остеопонтину [156, 158]. И наконец, недавние эксперименты на нокаутных мышах показали, что у животных, лишенных OPN, под влиянием гликоксалата образовывалось значительно меньше кристаллов оксалата кальция, чем у нормальных мышей [159].

Как совместить эти противоречивые результаты до конца не ясно, однако появляется все больше свидетельств, указывающих на то, что ключ к разгадке этих интригующих различий лежит в области посттрансляционных изменений протеина OPN. Установлено, что полипептидная последовательность остеопонтин подвергается обширным посттрансляционным модификациям, включая фосфорилирование, гликозилирование и сульфатирова-

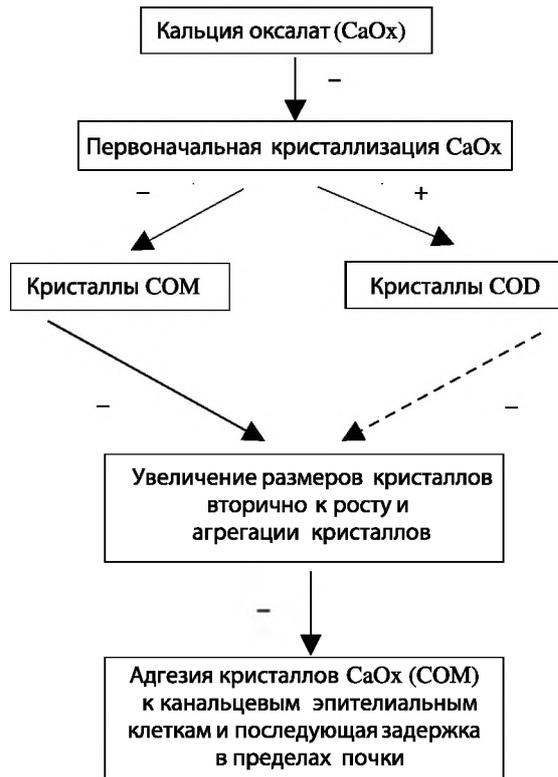
ние. Причем эти модификации варьируются в зависимости от вида животного и типа ткани [160–162]. Как уже отмечалось, в структуре OPN содержится значительное количество сериновых и треониновых остатков, которые представляют собой подходящие места для фосфорилирования. Была предложена гипотеза, согласно которой, чем большее количество таких остатков подвергается фосфорилированию, тем большую активность по ингибированию кристаллизации демонстрирует молекула OPN. Иными словами, вариации фосфорилирования молекулы остепонтина существенно регулируют процесс минерализации [75]. Выдвинутая гипотеза получила многочисленные подтверждения. Например, дефосфорилирование молекулы остепонтина приводило к ослаблению его способности подавлять рост кристаллов гидроксипатита *in vitro* [92, 163–165]. В другом исследовании искусственно воспроизведенные фосфорилированные молекулы остепонтина в концентрации 200 нмоль/л на 50% ингибировали рост кристаллов кальция оксалата моногидрата, в то время как дефосфорилированные молекулы OPN не обладали такой способностью [166]. Отметим также предположение, согласно которому более полно фосфорилированный пептид в процессе взаимодействия с кальциевыми депозитами подвергается легкому конформационному изменению, повышая посредством этого аффинитет к зонам роста кристалла [75, 167]. Как бы там ни было, комбинация большого числа остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот, значительного количества мест для фосфорилирования и наличия предполагаемых кальций-связывающих мотивов, по-видимому, обеспечивает способность остепонтина активно связывать ионы Ca^{2+} . По некоторым данным, величина этого связывания составляет 50 моль кальция на 1 моль OPN. Согласно другим расчетам, при концентрации Ca^{2+} 1–2 ммоль/л занятыми оказывается 25 из 50 потенциальных мест связывания в молекуле остепонтина, а полная их оккупация происходит при концентрации Ca^{2+} на уровне 5–10 ммоль/л [80, 168]. Кроме того, возможно анионные свойства OPN, как и в случае с протеином Тамма–Хорсфалла, обеспечивают образование на поверхности кальций-содержащих кристаллов своеобразное «покрывало», что задерживает дальнейший рост и пролиферацию последних [167].

Этим, однако, механизм действия остепонтина не исчерпывается. Эксперименты *in vitro* показали, что некоторые белковые макромолекулы, в том числе и остепонтин, ингибируют рост кристаллов кальция оксалата моногидрата (COM), направляя кристаллизацию по пути образования каль-

ция оксалата дигидрата (COD) [126]. Исследование, позднее проведенное в этой же лаборатории с использованием нокаутных животных, показало, что в почечных канальцах мышей с делецией гена OPN задерживались исключительно кристаллы COM [137]. 1992; Denhardt, Guo, 1993/.50 потенциальных мест связывания в молекуле остепонтина изменению. Давно известно, что наиболее термодинамически стабильная форма оксалата кальция COM является основным ингредиентом почечных камней, примерно вдвое превосходя содержание COD [169]. По неизвестным пока причинам COD имеет значительно более низкую способность образовывать в моче крупные агрегаты кристаллов и формировать прочные адгезивные контакты с клетками почечного эпителия. Поэтому конечная моча часто содержит отдельные микрокристаллы COD, изначально неспособные к активной агрегации и адгезии в пределах канальцев. Это позволяет считать образование кристаллов кальция оксалата дигидрата защитным процессом в условиях мочекаменной болезни [170]. По крайней мере, осаждение из одних и тех же порций мочи различных форм кристаллов оксалата кальция с помощью манипулирования концентрациями Ca^{2+} в окружающей среде показало, что преципитация COM происходила при содержании Ca^{2+} 2 ммоль/л, а COD – 7 ммоль/л [171].

Факт различного влияния белковых макромолекул на процесс кристаллизации хорошо известен в природе и носит название «кристаллический полиморфизм». Он обеспечивает, например, вариативность форм кристаллов кальция карбоната в различных раковинах моллюсков. Основа и механизмы возникновения кристаллического полиморфизма неизвестны, но для нас важным является то, что протеины, влияющие на этот процесс, как правило, являются полианионами, причем многие богаты мономерами аспарагиновой кислоты [149, 172]. Так что, по-видимому, такой эффект остепонтина не должен вызывать чрезмерного удивления. Что касается более высокой адгезивности кристаллов COM, этот вопрос также не выяснен. Возможно, это зависит от большего содержания в структуре COM фосфолипидных групп, в первую очередь фосфатидилсерина, известного стимулятора кристаллизации [173]. Кроме того, давно существует предположение о том, что различия в порядке расположения молекул воды в кристаллических решетках COM и COD, а также в величине заряда их поверхности обуславливают особенности их взаимодействия с адсорбентом и мембранолитические свойства COM [174–177].

На основе описанных механизмов действия



Один из предполагаемых механизмов действия остеопонтина (по J.A. Wesson et al., 2003). – Ингибирование остеопонтином; + Стимулирование остеопонтином.

остеопонтина рядом исследователей была предложена гипотетическая схема, отражающая его ингибирующий эффект в отношении образования кальций-оксалатных камней почек [136, 137].

В последние годы благодаря активным усилиям австралийских исследователей группы R.L.Ryall разрабатывается новая идея дополнительного механизма действия белковых макромолекул, в том числе и остеопонтина, по ослаблению процесса мочевой кристаллизации. Проводимый с использованием современных методов анализ почечных конкрементов показал наличие в них, кроме неорганической структуры, большого количества органических включений, главным образом протеинов. Некоторые из них остаются пока неидентифицированными, другие – являются неперменным атрибутом воспалительного процесса, третьи – представляют собой рассматриваемые здесь защищающие от нефролитиаза макромолекулы [178–182]. Среди последних детектирован и остеопонтин [171, 183–185]. M.C.Chauvet и R.L.Ryall культивировали почечные клетки в условиях добавления трех типов кристаллов оксалата кальция: COM_1 , содержащих только неорганическую фракцию кристалла; COM_{CF} , преципитированных из нормальной центрифугированной и профильтрованной мочи человека, и COM_{UF} , осажденных из мочи, подвергнутой ультрафильтрации и содержащих протеины, не

превышающие 10 kDa [186]. Оказалось, что наиболее активно прикреплялись к клеткам кристаллы COM_1 , менее активно – COM_{UF} и наименьшей адгезивностью обладали кристаллы COM_{CF} . Затем с помощью сканирующей электронной микроскопии определили, что последний тип кристаллов наиболее быстро (в течение 2 мин) поглощался клетками и подвергался быстрой и полной деструкции в течение 60 мин, в то время как кристаллы COM_{UF} значительно медленнее интернализировались и деградировали. Полученные результаты позволили авторам выдвинуть следующую гипотезу. По-видимому, мочевые протеины могут играть двойную протективную роль. Первая: за счет инкорпорирования в кристаллы они снижают аффинитет последних к почечным клеткам. Вторая: облегчают внутриклеточную деструкцию кристаллов после их поглощения почечными клетками [171, 179, 180, 186]. В другом исследовании эти же авторы изучали скорость растворения меченных по [^{14}C] кристаллов оксалата кальция в культуре клеточной линии почек MDCK II при добавлении возрастающих концентраций экстракта, полученного из матрикса кристаллов COM [187]. Оказалось, что повышение концентрации экстракта приводило к пропорциональному уменьшению размеров кристаллов и к увеличению выхода радиоактивной метки в культуральную среду. Полученные результаты подтвердились данными сканирующей электронной микроскопии и явились очередным свидетельством участия внутрикристаллических протеинов в деградации и растворении кристаллов $CaOx$.

Каков механизм обнаруженного эффекта? По мнению приведенных авторов, события разворачиваются следующим образом. Проникновение белковых макромолекул в кристалл создает определенные дефекты в его структуре и повышает напряжение кристаллической решетки, что делает образовавшуюся структуру более чувствительной к протеолитическому воздействию лизосомальных энзимов. Через своеобразные каналы, пронизывающие кристалл, создаваемые и заполненные протеинами, протеазы проникают в структуру кристалла, что способствует его деструкции и последующему растворению [187]. Что касается ферментативной активности, в эпителии различных отделов почечных канальцев выявлен целый набор протеаз, способных осуществить описанный эффект [188–191]. При этом не исключено, что в процессе деградации кристаллов принимают участие лизосомальные энзимы не только почечных клеток, но и окружающих макрофагов и мультинуклеарных гигантских клеток, которые способны по-

площадь микрокристаллы [192–196]. По крайней мере, кристаллы оксалата кальция были зафиксированы внутри фаголизосом культивируемых макрофагов, так же как и в лизосомах почечных клеток *in vivo* и *in vitro* [194, 197, 198]. По-видимому, фагоцитирование кристаллов, прикрепленных к клеточным мембранам, следует за образованием фаголизосом, чья внутренняя среда, имеющая кислый рН и содержащая комплекс лизосомальных протеаз, создает идеальные условия для разрушения кристалла. Протеазы расщепляют протеиновую фазу кристалла, образуя за счет этого дефекты в минерале, что должно увеличить площадь его поверхности и облегчить растворение кристалла в кислой среде [187].

Учитывая отмеченную роль кислой среды в растворении кристаллов, нельзя не остановиться на очередной интересной гипотезе, имеющей прямое отношение к рассматриваемому вопросу. Нокаутным мышам, лишенным нормального гена остеопонтина, подкожно имплантировали фрагменты аортальных клапанов для изучения эктопической кальцификации [167]. Оказалось, что процесс кальцификации клапанов у нокаутных мышей в 4–5 раз превосходил таковой у нормальных животных. Авторами было предположено, что OPN не только ингибирует отложение кристаллов, но и активно стимулирует их растворение. Последнее авторы связывают с тем, что, как установлено в эксперименте, остеопонтин стимулирует индукцию энзима карбоангидразы II, катализирующего, как известно, внутриклеточное образование угольной кислоты из двуокси углерода. В приведенных экспериментах экспрессия карбоангидразы II резко повышалась в макрофагах и многоядерных гигантских клетках, окружающих имплантаты. Это обусловило повышенное образование угольной кислоты, диссоциация которой резко увеличивала внутриклеточное содержание ионов водорода. Выброс протонов из клетки с помощью вакуольной H⁺-АТФазы приводит к подкислению окружающей среды, что, в свою очередь, создает условия для растворения кристаллов. Важным является тот факт, что активность карбоангидразы четко коррелировала как со степенью минерализации имплантата, так и с уровнем остеопонтина в образовавшихся кристаллах апатита. Это позволило авторам высказать предположение, согласно которому OPN индуцирует локальную экспрессию карбоангидразы в окружающих макрофагах и гигантских клетках, что способствует деструкции образующихся кристаллов за счет ацидификации окружающей микросреды [167]. Вполне вероятно, что аналогичный процесс происходит и в почках и является одним из

способов защиты от эктопической кальцификации. От себя добавим, что, возможно, подавление описываемого процесса лежит в основе хорошо известного факта образования почечных камней под влиянием ингибитора карбоангидразы ацетазоламида [199].

Суммируя приведенные данные, отметим, что гликопротеин остеопонтин является важной макромолекулой, модулирующей процесс эктопической кальцификации в почке. Ингибирующий эффект остеопонтина, по-видимому, обусловлен как способностью связывать кальциевые микрокристаллы, нарушая их контакт с клетками почечного эпителия, так и активацией процесса деградаци и последующего растворения кристаллов. Ингибирующая активность остеопонтина зависит от уровня его посттрансляционной модификации и, в первую очередь, от степени фосфорилирования его молекулы.

Бикунин

В начале 1960-х годов из плазмы крови человека был выделен, очищен и идентифицирован новый трипсиновый ингибитор. По результатам электрофореза на бумаге протеин получил название «интер-альфа-трипсиновый ингибитор» [200, 201]. Однако впоследствии, исходя из того, что в норме трипсин в плазме крови отсутствует, название было редуцировано до «интер-альфа-ингибитор» (I α I), хотя и первое до сих пор встречается в литературе [202]. Вскоре выяснилось, что семейство интер-альфа-ингибиторов включает целый ряд внеклеточных протеинов, которые являются важными модуляторами состава внеклеточного матрикса различных органов [203].

Изучение строения интер-альфа-ингибитора показало, что он состоит из трех полипептидных цепей: двух тяжелых с молекулярной массой около 80 kDa каждая, названных HC1 и HC2, и легкой цепи (30–40 kDa), получившей название «бикунин». Тот же бикунин, как оказалось, является структурным элементом другого близкого протеина, в состав которого входит также одна тяжелая цепь (HC3), гомологичная таковым в I α I. Этот новый плазменный протеин получил название «пре-альфа-ингибитор» [204–207]. В обоих отмеченных протеинах семейства интер-альфа-ингибиторов бикунин несет хондроитин сульфатную цепочку, с помощью которой ковалентно связывается с тяжелыми цепями. Кроме того, молекула бикунина содержит два домена типа Кунитца, имеющих важное значение в механизме действия протеинов. Выяснилось также, что оба протеина обладают мощным антипротеазным действием, ингибируя активность трипсина, химотрипсина, катепсина,

эластазы, плазмина, калликреина, а также ряда факторов каскада свертывания крови [208–214]. Показано, что ингибирующая способность обусловлена, главным образом, наличием бикунина [215]. Это, в конечном счете, и определяет функциональную роль описываемых протеинов. Было установлено, что бикунин предотвращает инвазию и метастазирование раковых клеток, обеспечивает процесс нормальной овуляции и оплодотворения, регулирует продукцию цитокинов, интенсивность воспалительной реакции, внутриклеточное содержание кальция. Относительно роли тяжелых цепей протеинов семейства IαI существует мнение, что они образуют связи с гиалуриновой кислотой и за счет этого стабилизируют внеклеточный матрикс различных органов [202, 213, 216–219].

В контексте обсуждаемой здесь проблемы большое значение имеет бесспорный факт ингибирующего воздействия бикунина на процесс образования кальций-оксалатных камней почек. В этой связи отметим два важных момента. Первый: установлено, что бикунин встречается не только в составе интер-альфа-ингибиторов, но и в свободном состоянии в виде отдельных молекул в плазме крови и моче [211, 215, 220–223]. При этом существует точка зрения, согласно которой в связанном состоянии бикунин теряет некоторые виды своей функциональной активности. А его высвобождение при протеолитической деградации протеинов IαI играет роль регуляторного механизма и приводит к восстановлению этих свойств [213]. Второй момент касается происхождения бикунина. Выяснено, что протеины семейства интер-альфа-ингибиторов синтезируются в печени, после чего секретируются в общий кровоток. Вопрос об ином происхождении бикунина на протяжении длительного времени не обсуждался.

В 1993 г. F.Atmani и соавт., исследуя макромолекулы, ингибирующие образование кальциевых мочевых камней, обнаружили в моче гликопротеин, содержащий остатки уроновой кислоты, который был выделен из мочи здоровых лиц, пациентов с мочекаменной болезнью и крыс и получил название «протеин, богатый уроновой кислотой» [220]. Углубленное изучение этого протеина показало, что по молекулярной массе и химической структуре он близок к семейству IαI [222, 224, 225]. Но еще до этого S.Sorensen и соавт. изолировали из нормальной человеческой мочи неидентифицированный протеин с молекулярной массой около 40 kDa, близкий к интер-альфа-ингибиторам, кристаллизаций оксалата кальция [226]. В специальном исследовании проведен всесторонний сравнительный анализ протеина, богатого уроновой кислотой, и бикунина [227].

Результаты показали следующее: 1. Секвенирование молекул выявило идентичность первых 25 аминокислотных остатков у N-терминального конца. 2. Western блоттинг с использованием поликлональных антител к бикунину иммунологически подтвердил факт выявленной идентичности. 3. У обоих протеинов зарегистрирована ингибирующая активность в отношении кристаллизации оксалата кальция. Был сделан вывод о том, что протеин, богатый уроновой кислотой, является бикунином, который в почке подавляет процесс кристаллизации CaOx. Интересно, что молекулярная масса изученных протеинов не совпала. Если у «классического» бикунина этот показатель был равен 45 kDa, то у сравниваемого протеина молекулярная масса составила 35 kDa. Это позволило авторам сделать вывод о двух мочевых бикунинах 35 и 45 kDa. Различие между ними, вероятно, обусловлено особенностями происхождения. Возможно, что один из них изначально находился в плазме крови в составе протеина из семейства IαI, а второй – в свободном виде. В процессе протеолитического расщепления первого могли произойти незначительные модификации, обусловившие его отличие от второго [227]. Не исключено, что и известный ингибитор мочевой кристаллизации нефрокальцин так же аналогичен HI-14, известному фрагменту бикунина [223]. По крайней мере, выявлены идентичность их молекулярной массы, последовательности первых 20 аминокислотных остатков и сопоставимая ингибиторная активность в отношении кристаллизации оксалата кальция.

Возвращаясь к происхождению мочевого бикунина, сегодня можно считать установленной возможность его образования не только в печени, но и при определенных условиях – в почках. По крайней мере, у крыс с экспериментальным кальций-оксалатным нефролитиазом почечная экспрессия мРНК бикунина после 8 нед потребления этиленгликоля в 17 раз превосходила исходный уровень [228]. Авторы связывают этот эффект с гипероксалурией и повреждающим провоспалительным действием оксалата кальция, провоцирующими образование бикунина. Это хорошо укладывается в известную теорию S.R.Khan, в лаборатории которого было проведено цитируемое исследование, о роли повреждающих факторов, лежащих в основе развития оксалатного нефролитиаза [229, 230]. Не так давно это предположение получило подтверждение в экспериментах на культуре почечных клеток LLC-PK1. Воздействие оксалата приводило к резкому повышению экспрессии этими клетками гена AMBP, кодирующего в том числе и образование бикунина [231].

Приведенные результаты относительно почеч-

ного происхождения бикунина получили подтверждение в целом ряде экспериментальных исследований. Иммуногистохимический анализ почек здоровых крыс показал наличие всех основных протеинов семейства I α I лишь на люминальной поверхности эпителия проксимальных канальцев. В то же время, после 8 нед экспериментальной гипероксалурии положительное окрашивание, указывающее на наличие как интер-альфа-ингибитора, так и бикунина, фиксировалось и в просвете канальцев, и в цитоплазме эпителиальных клеток различных отделов нефрона [232–234]. В другой работе иммуногистохимическое окрашивание продемонстрировало наличие бикунина в эпителии проксимальных канальцев, а также вблизи тонкого нисходящего отдела петли Генле нефрона человека [235].

Способность бикунина существенно ингибировать процесс образования кристаллов CaOx была четко продемонстрирована в экспериментах *in vitro* [224, 227, 233, 236, 237]. Так, на культуре почечных клеток MDCK добавление 10 нг/мл бикунина ингибировало адгезию кристаллов кальция оксалата моногидрата, а концентрация 200 нг/мл полностью подавляла процесс кристаллизации [238]. В другом исследовании присутствие в среде 8 мкг/мл бикунина на 80% ингибировало образование CaOx из хлорида кальция и оксалата аммония, что оценивалось по изменению радиоактивности супернатанта после 60 мин инкубирования [239]. А добавление мочевого бикунина в концентрациях от 2,5 до 20 мкг/мл замедляло нуклеацию образующихся кристаллов на 67 и 58% и ингибировало их агрегацию на 59 и 80% соответственно [240].

Для оценки роли функциональных доменов интер-альфа-ингибиторов в подавлении кристаллизации оксалата кальция исследовали влияние отдельных фрагментов молекулы комплексного протеина, в том числе тяжелых цепей I α I, бикунина, а также карбокси-терминального домена бикунина. Оказалось, что бикунин и его карбокси-терминальный фрагмент эффективно и сопоставимо ингибировали кристаллизацию оксалата кальция. Цельная же молекула I α I оказывала значительно более слабое воздействие [241]. Полученные результаты позволили авторам сделать вывод, согласно которому за угнетение процесса кристаллизации оксалата кальция в почке ответствен, главным образом, карбокси-терминальный домен бикунина.

Соответствуют ли приведенные данные роли бикунина в патогенезе образования оксалатных камней *in vivo* до конца не ясно. Имеющиеся скудные данные часто носят противоречивый харак-

тер и порой с трудом поддаются интерпретации. Так, с одной стороны, протеины семейства интер-альфа-ингибиторов более часто определялись в моче мужчин с оксалатным нефролитиазом, чем у здоровых людей [242]. В соответствии с результатами, полученными на животных, у людей, страдающих оксалатным нефролитиазом, фрагменты I α I фиксировались в эпителии собирательных трубок, тонкого отдела петли Генле и в клетках почечного интерстиция, тогда как у здоровых лиц – только в интерстициальном матриксе почки [243]. С другой стороны – имеются данные, согласно которым средняя концентрация бикунина в моче у 18 здоровых людей была на 50% выше, чем у 31 пациента, страдающего кальций-оксалатным нефролитиазом [239]. Точного ответа, способного привести к консенсусу, пока нет. Тем более, не совсем ясными выглядят здесь причинно-следственные связи. Или увеличение бикунина в моче является, как в случае с экспериментальным нефролитиазом, следствием воздействия гипероксалурии на почечную ткань, или нефролитиаз развивается как следствие недостатка образования в почках бикунина, что и обуславливает усиление кристаллизации. Возможно, ответ следует искать в качественных различиях рассматриваемых протеинов. Так, иммунологическое определение бикунина в моче у 18 пациентов с мочекаменной болезнью и у 77 здоровых контрольных лиц показало, что среднее соотношение мочевого содержания бикунина и креатинина у больных было почти вдвое выше, чем в контрольной группе. Однако Western блоттинг образцов мочи дал весьма неожиданные результаты. Оказалось, что значительно большее количество пациентов с нефролитиазом имело в моче аберрантный бикунин с молекулярной массой 25 kDa (10 из 18 – 55,6%), в то время как среди здоровых лиц таких было лишь 19,5% (15 из 77). Основная же часть образцов мочи людей из контрольной группы содержала «нормальный» бикунин с молекулярной массой 40 kDa [244]. Сравнение этих двух протеинов, проведенное авторами, продемонстрировало, что более мелкие фрагменты (25 kDa) были идентичны дегликозилированному бикунину и проявляли значительно меньшую активность в отношении ингибирования кристаллизации. Так что, вполне возможно, что, как и в случае с остеопонтином, функциональная активность бикунина определяется степенью посттрансляционных изменений его молекулы.

Касаясь механизмов действия бикунина, мы вынуждены ограничиваться исключительно предположениями. Сегодня ясно лишь, что молекула бикунина содержит места, имеющие высокий аф-

финитет к ионам Ca^{2+} . Поэтому вполне можно ожидать, что бикунин осуществляет хелатирование ионов кальция, предотвращая его участие в кристаллизации. Однако это предположение не является единственным.

Не исключено, что молекула бикунина ингибирует связывание Ca^{2+} с кристаллами благодаря электростатическому эффекту, что обусловлено наличием положительно заряженного кластера в карбокси-терминальном домене протеина. Присутствие положительно заряженного протеина изменяет электростатический потенциал поверхности рядом с кристаллами. А это, в свою очередь, отталкивает катионы и может привести к уменьшению локальной концентрации ионов Ca^{2+} [245].

Следующий возможный механизм предполагает связывание бикунина с кристаллами оксалата кальция, что индуцирует определенные изменения структуры кристаллов и их матричных протеинов. Это ведет к изменению организации кристаллической решетки и нарушает обычную кинетику формирования кальциевых кристаллов [241].

В любом случае, точные механизмы, с помощью которых бикунин ингибирует процесс образования кристаллов оксалата кальция, нуждаются в серьезном изучении.

Таким образом, бикунин является одним из протеинов, угнетающих процесс кристаллизации в почках. Являясь частью молекулы протеинов семейства интер-альфа-ингибиторов, а также синтезируясь в нефроне под влиянием гипероксалурии и повышенного содержания оксалата в почках, бикунин нарушает образование полноценных кристаллов оксалата кальция за счет взаимодействия с ионами Ca_{2+} или нарушения кинетики образования кальциевых кристаллов.

Фрагмент протромбина 1

В начале 1990-х годов в ходе исследования состава органической матрицы оксалатных камней было обнаружено, что большая ее часть состоит из некоего белка, который изначально получил название «белок кристаллической матрицы» (БКМ) [246]. Значимый вклад в изучение этого протеина внесла группа австралийских исследователей под руководством R.L.Ryall и A.M.Stapleton. В 1993 г. они установили, что последовательность N-терминальных аминокислот белка на 81,8% идентична N-терминалям протромбина [247]. Через год в Японии определили молекулярный вес описываемого протеина – 31 kDa [248]. В этой же работе было показано, что поликлональные антитела к БКМ и протромбину проявляли перекрестную чувствительность в ходе Western блоттинга, что позволило сделать вывод – БКМ является активи-

рованным пептидом протромбина [248]. В очередном эксперименте индуцировали кристаллизацию оксалата кальция в ультрафильтрате мочи с добавлением плазмы и сыворотки крови, взятых у здоровых людей. Образовавшиеся кристаллы деминерализовывали и проводили исследование белкового экстракта. Анализ показал, что белковая матрица кристаллов, выращенных в ультрафильтрате мочи с добавлением сыворотки крови, содержала значительное количество фрагментов протромбина 1 и 2, один из которых, как показал электрофорез, являлся белком кристаллической матрицы. Затем при использовании стандартных образцов фрагментов протромбина 1 и 2 удалось точно идентифицировать БКМ как фрагмент протромбина 1 [249]. Эти результаты были подтверждены и другими исследованиями [250–253]. Таким образом, было установлено, что наряду с остеопонтином, протеином Тамма–Хорсфалла и бикунинном, фрагмент протромбина 1 (ФП1) является структурным компонентом белковой матрицы оксалатных камней. При этом, как и в отношении других протеинов, факт присутствия ФП1 в органической матрице кристаллов может интерпретироваться двояко: либо он является ингибитором камнеобразования, либо, напротив, стимулирует этот процесс.

В настоящее время ФП1 принято считать ингибитором литогенеза, хотя и здесь все не столь однозначно. Первые результаты, позиционирующие ФП1 в качестве ингибитора камнеобразования, были также получены австралийскими исследователями. В условиях экспериментальной кристаллизации в человеческой моче они показали, что ФП1 не влиял на концентрацию ионов оксалата, необходимую для образования кристаллов, но увеличивал количество кальций-оксалатных депозитов. Однако, что принципиально важно, величина этих частиц был значительно меньше обычных и уменьшалась обратно пропорционально содержанию ФП1 в моче. Данное наблюдение продемонстрировало, что ФП1 в первую очередь ингибирует агрегацию кристаллов CaOx . Более того, в дальнейшем удалось зафиксировать зависимое от дозы ФП1 уменьшение депонирования кристаллического материала. Это могло означать, что ФП1 встраивается в архитектуру кристаллов и нарушает их склеивание, что и обуславливает увеличение количества более мелких депозитов [254]. Сравнительное изучение протромбина, тромбина и фрагментов протромбина 1 и 2 на процесс кристаллизации *in vitro* показало, что все эти вещества в определенной степени ингибируют агрегацию кристаллов. Их активность характеризовалась следующей

последовательностью: ФП1 > протромбин > ФП2 > тромбин. Параллельно ¹⁴C-оксалатный анализ показал, что ФП1 в наибольшей степени уменьшал так же и количество минеральных депозитов [255, 256]. Исходя из полученных результатов, было сделано предположение, что для антилитогенного эффекта протромбина или продуктов его распада принципиально важно наличие в их структуре домена γ -карбоксиглутаминовой кислоты, который имеется у протромбина и ФП1, но отсутствует у тромбина и ФП2. При этом превосходящий по силе ингибирующий эффект ФП1 в сравнении с протромбином определяется большим по величине соотношением заряда молекулы к ее массе [255, 256]. Так что, согласно современным представлениям, механизм антилитогенного действия ФП1 выглядит следующим образом. За счет значительного количества отрицательно заряженных групп γ -карбоксиглутаминовой кислоты и небольшой молекулярной массы ФП1 связывается с положительно заряженными областями кристаллов оксалата кальция и образует протеиновое «покрывало», препятствуя нуклеации и агрегации кристаллического материала [5, 123, 257, 258].

Тем не менее, ФП1 все же не всегда способен предотвращать развитие нефролитиаза. Прямых экспериментальных доказательств того, что ФП1 может становиться стимулятором камнеобразования, нам не встретилось. Однако есть ряд свидетельств, указывающих на возможные изменения структуры ФП1, ведущие к ослаблению его антилитогенных свойств. Так, в университете Кейптауна (ЮАР) было проведено сравнительное исследование ингибирующей активности ФП1, выделенного из мочи чернокожих и белых людей [259]. Известно, что коренное население африканского континента страдает нефролитиазом гораздо реже, чем белые (1% против 12–15%). Авторы предположили, что данный факт может быть обусловлен межрасовыми различиями состава мочи, в том числе, структурными особенностями ФП. И действительно, эксперименты показали, что ингибирующая активность ФП1 чернокожих людей существенно превышает таковую для ФП1 белых: 46,5% против 31,7%. При этом данный показатель существенно снижался, если указанный белок добавляли в мочу людей другой расы [259]. Учитывая данные наблюдения, было сделано предположение: на антилитогенную активность ФП1 может оказывать влияние состав мочи через изменение конформации гликопротеина. В более поздних экспериментах были изучены структурные различия N-концевых и O-концевых олигосахаридов, выделенных из ФП1 больных МКБ и здоровых людей обеих рас.

Оказалось, что ключевым различием является степень сиализации ФП1. O-гликаны ФП1 обеих контрольных групп и N-гликаны ФП1 здоровых чернокожих людей в значительно большей степени сиализированы по сравнению с таковыми у больных МКБ белой расы [260]. Кроме того, появились сведения о том, что способность ФП1 предотвращать нуклеацию и агрегацию кристаллов определяется степенью гликозилирования молекулы [261].

Интересные данные были получены в экспериментах по изучению кристаллизации в условиях применения непрямого антикоагулянта варфарина [262]. Как известно, варфарин блокирует в печени гамма-карбоксилирование витамин K-зависимых белков, в том числе – фрагмента протромбина 1 [263]. Поэтому возникло предположение, что антикоагулянтная терапия может ослабить ингибирующую активность ФП1. В опытах была изучена способность ФП1 предотвращать кристаллизацию в моче больных, длительно получавших варфарин в связи с кардиохирургическими вмешательствами. Оказалось, что органическая матрица почечных камней, выращенных в этих условиях, в основном содержит слабо карбоксилированные молекулы ФП1. Однако на выраженность антилитогенного эффекта данное обстоятельство практически не влияло. Учитывая сказанное, можно предположить, что наличие правильной последовательности остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты в молекуле ФП1 имеет важное, но не определяющее значение в механизме его ингибирующего действия.

Естественно, что, помимо качественных деструкций, молекулы ФП1 на выраженность антилитогенного эффекта могут оказывать влияние количественные изменения его концентрации в моче. Часть молекул ФП1 может попадать в нефрон из крови после распада протромбина. Однако выяснено, что синтез ФП1 осуществляется и непосредственно в нефроцитах, поскольку экспрессия специфической мРНК обнаружена в почке человека [264]. При этом на фоне развития МКБ уровень экспрессии данной мРНК претерпевает существенные изменения, о чем свидетельствуют экспериментальные данные. Исследования показали, что в условиях экспериментального нефролитиаза, вызванного ежедневным потреблением крысами 0,75% раствора этиленгликоля в течение 8 нед, количество мРНК ФП1 снижается на 42% [265]. Правда, установить, что послужило непосредственной причиной этого снижения, не удалось. Существуют сведения, что количество ФП1 в моче и его активность зависят от концентрации ионов кальция. Так, было показано, что ФП1 активен в боль-

шей мере при низкой концентрации свободных ионов Ca^{2+} в моче, тогда как, например, остеопонтин – при высокой [116]. Возможно, зависимость ФП1 от содержания кальция в моче объясняется конформационными изменениями, которые вызывает этот ион при взаимодействии с молекулой гликопротеина [266, 267]. Показано также, что ФП1 *in vitro* стимулирует преобразование моногидратов оксалата кальция (СОМ) в дигидрат (СОД), который, как уже отмечалось, является значительно менее литогенным [71]. Вместе с тем, встречаются данные, противоречащие этому наблюдению. Показано, что в моче людей ФП1 встраивается преимущественно в кристаллы СОМ, а в органической матрице СОД он практически не обнаруживается [267]. Возможно, эти противоречия обусловлены различиями экспериментальных условий либо какими-то особенностями камнеобразования *in vivo*. В любом случае, данный вопрос нуждается в дополнительных исследованиях.

Таким образом, согласно современным представлениям, фрагмент протромбина 1 является одним из основных ингибиторов кристаллизации. Его действие основано на взаимодействии с кристаллами и образовании вокруг них протеинового «покрывала», которое препятствует адгезии кристаллического материала к клеткам уротелия и его дальнейшей агрегации. Не исключено, что антилитогенная активность ФП1 зависит от степени сиализации, гликозилирования и гамма-карбоксилирования молекулы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Зверев ЯФ, Брюханов ВМ, Лампатов ВВ, Жариков АЮ. Современные представления о роли физико-химических факторов в патогенезе кальциевого нефролитиаза. *Нефрология* 2009; 13 (1): 39–50
- Khan SR, Kok DJ. *Modulators of urinary stone formation*. Front Biosci; 2004; 9: 1450–1482
- Kumar V, Lieske JC. Protein regulation of intrarenal crystallization. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15 (4): 374–380
- Dent CE, Sutor DJ. Presence or absence of inhibitor of calcium-oxalate crystal growth in urine of normals and of stoneformers. *Lancet* 1971; 1: 776–778
- Kumar V, Farrell G, Lieske JC. Whole urinary proteins coat calcium oxalate monohydrate crystals to greatly decrease their adhesion to renal cells. *J Urol* 2003; 170 (1): 221–225
- Tamm I, Horsfall FL. Characterization and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1950; 74: 108–114
- Майданник ВГ, Драник ГН. Белок Тамма–Хорсфалла: патогенетическая роль и клиническое значение при урологических и нефрологических заболеваниях. *Урол и нефрол* 1990; (5): 69–74
- Kumar S, Muchmore S. Tamm-Horsfall protein-uromodulin (1950-1990). *Kidney Int* 1990; 37: 1395–1401
- Gottschalk A. Carbohydrate residue of a urine mucoprotein inhibiting influenza virus haemagglutination. *Nature* 1952; 170: 662–663
- Grant AM, Neuberger A. The development of a radioimmunoassay for the measurement of urinary Tamm-Horsfall glycoprotein in the presence of sodium dodecyl sulphate. *Clin Sci* 1973; 44: 163–179
- Williams J, Marshall RD, van Halbeek H, Vliegenthart JF. Structural analysis of the carbohydrate moieties of human Tamm-Horsfall glycoprotein. *Carbohydr Res* 1984; 134 (1): 141–155
- Muchmore AV, Decker JM. Uromodulin: a unique 85-kilodalton immunosuppressive glycoprotein isolated from urine of pregnant women. *Science* 1985; 229: 479–481
- Peraldi MN. Tamm-Horsfall protein. *Nephrologie* 1992; 13 (1): 7–11
- Devuyst O, Dahan K, Pirson Y. Tamm-Horsfall protein or uromodulin: new ideas about an old molecule. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20 (7): 1290–1294
- Serafini-Cessi F, Malagolini N, Cavallone D. Tamm-Horsfall glycoprotein: biology and clinical relevance. *Am J Kidney Dis* 2003; 658–676
- Gadella BM. The assembly of a zona pellucida binding protein complex in sperm. *Reprod Domest Anim* 2008; 43 (5): 12–19
- Oelschlaeger T, Funfstuck R. Recurrent urinary tract infections in women. Virulence of pathogens and host reaction. *Urologe A* 2006; 45 (4): 412, 414–416, 418–420
- Pennica D, Kohr WJ, Kuang WJ et al. Identification of human uromodulin as the Tamm-Horsfall urinary glycoprotein. *Science* 1987; 236: 83–88
- Bachmann S, Koeppen-Hagemann I, Kriz W. Ultrastructural localization of Tamm-Horsfall glycoprotein (THP) in rat kidney as revealed by protein A-gold immunocytochemistry. *Histochemistry* 1985; 83 (6): 531–538
- Bachmann S, Metzger R, Bunnemann B. Tamm-Horsfall protein-mRNA synthesis is localized to the thick ascending limb of Henle's loop in rat kidney. *Histochemistry* 1990; 94 (5): 517–523
- Malagolini N, Cavallone D, Serafini-Cessi F. Intracellular transport, cell-surface exposure and release of recombinant Tamm-Horsfall glycoprotein. *Kidney Int* 1997; 52 (5): 1340–1350
- Pook MA, Jeremiah S, Scheinman SJ et al. Localization of the Tamm-Horsfall glycoprotein (uromodulin) gene to chromosome 16p12.3-16p13.11. *Ann Hum Genet* 1993; 57 (4): 285–290
- Glauser A, Hochreiter W, Jaeger P, Hess B. Determinants of urinary excretion of Tamm-Horsfall protein in non-selected kidney stone formers and healthy subjects. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1580–1587
- Bichler KH, Kirchner Ch, Ideler V. Uromucoid excretion in normal individuals and stone formers. *Br J Urol* 1976; 47: 733–738
- Samuell CT. Uromucoid excretion in normal subjects, calcium stone formers and in patients with chronic renal failure. *Urol Res* 1979; 7: 5–12
- Thornley C, Dawnay A, Cattell WR. Human Tamm-Horsfall glycoprotein: urinary and plasma levels in normal subjects and patients with renal disease determined by a fully validated radioimmunoassay. *Clin Sci* 1985; 68: 529–535
- Scurr DS, Robertson WG. Modifiers of calcium oxalate crystallization found in urine. II. Studies on their mode of action in an artificial urine. *J Urol* 1986; 136: 128–131
- Hess B, Zipperle L, Jaeger Ph. Citrate and calcium effects on Tamm-Horsfall glycoprotein as a modifier of calcium oxalate crystal aggregation. *Am J Physiol* 1993; 265: F784–779
- Hebert SC. Bartter syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12: 527–532
- Peters M, Ermert S, Jeck N et al. Classification and rescue of ROMK mutations underlying hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome. *Kidney Int* 2003; 64: 923–932
- Зверев ЯФ, Брюханов ВМ, Лампатов ВВ. Заболевания и синдромы, обусловленные генетическими нарушениями почечного транспорта электролитов. *Нефрология* 2004; 8 (4): 11–24
- Ying WZ, Sanders PW. Dietary salt regulates expression of Tamm-Horsfall glycoprotein in rats. *Kidney Int* 1998; 54 (4): 1150–1156

33. Bachmann S, Dawney AB, Bouby N, Bankir L. Tamm-Horsfall protein excretion during chronic alterations in urinary concentration and protein intake in the rat. *Renal Physiol Biochem* 1991; 14: 236–245
34. Bachmann S, Mutig K, Bates J et al. Renal effects of Tamm-Horsfall protein (uromodulin) deficiency in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F559–F567
35. Rampoldi L, Caridi G, Santon D et al. Allelism of MCKD, FJHN and GCKD caused by impairment of uromodulin export dynamics. *Hum Mol Genet* 2003; 15: 3369–3384
36. Schmitt R, Kahl T, Mutig K, Bachmann S. Selectively reduced expression of thick ascending limb Tamm-Horsfall protein in hypothyroid kidneys. *Histochem Cell Biol* 2004; 121 (4): 319–327
37. Fruhauf JH, Welker P, Mutig K et al. Lipid raft association of essential proteins of the thick ascending limb. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 561A
38. Kim GH, Ecelbarger CA, Mitchell C et al. Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol Renal Physiol* 1999; 276: F96–F103
39. Grant AMS, Baker LRI, Neuberger A. Urinary Tamm-Horsfall glycoprotein in certain kidney diseases and its content in renal and bladder calculi. *Clin Sci* 1973; 44: 377–384
40. Bichler KH. Thirty-eight years of stone meetings in Europe. *Urol Res* 2006; 34 (2): 70–78
41. 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
42. Khan SR. Interactions between stone-forming calcific crystals and macromolecules. *Urol Int* 1997; 59: 59–71
43. Doyle IR, Ryall RL, Marshall VR. Inclusion of proteins into calcium oxalate crystals precipitated from human urine: a highly selective phenomenon. *Clin Chem* 1991; 37: 1589–1594
44. Kulaksizoglu S, Sofikerim M, Cevik C. Impact of various modifiers on calcium oxalate crystallization. *J Urol* 2007; 14: 214–218
45. Hess B, Jordi S, Zipperle L et al. Citrate determines calcium oxalate crystallization kinetics and crystal morphology-studies in the presence of Tamm-Horsfall protein of a healthy subject and a severely recurrent calcium stone former. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (3): 366–374
46. Kumar V, Peca de la Vega L, Farell G, Lieske JC. Urinary macromolecular inhibition of crystal adhesion to renal epithelial cells is impaired in male stone formers. *Kidney Int* 2005; 68 (4): 1784–1792
47. Mo L, Huang HY, Zhu XH et al. Tamm-Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation. *Kidney Int* 2004; 66 (3): 1159–1166
48. Wikström B, Wieslander J. Excretion of Tamm-Horsfall urinary glycoprotein (uromucoid) in renal stone formers. In: Smith LH et al. eds. Urolithiasis, Clinical and Basic Research. Plenum Press, New York, 1981; 685–688
49. Erwin DT, Kok DJ, Alam J et al. Calcium oxalate stone agglomeration reflects stone-forming activity: citrate inhibition depends on macromolecules larger than 30 kilodalton. *Am J Kidney Dis* 1994; 24 (6): 893–900
50. Romero MC, Nocera S, Nesse AB. Decreased Tamm-Horsfall protein in lithiasic patients. *Clin Biochem* 1997; 30 (1): 63–67
51. Hess B, Nakagawa Y, Parks JH, Coe FL. Molecular abnormality of Tamm-Horsfall glycoprotein in calcium oxalate nephrolithiasis. *Am J Physiol* 1991; 260 (4 Pt 2): F569–578
52. Boevij ER, Cao LC, De Bruijn WC et al. Zeta potential distribution on calcium oxalate crystal and Tamm-Horsfall protein surface analyzed with Doppler electrophoretic light scattering. *J Urol* 1994; 152 (2 Pt 1): 531–536
53. Storey EL, Anderson GJ, Mack U et al. Desialylated transferrin as a serological marker of chronic excessive alcohol ingestion. *Lancet* 1987; i: 1292–1294
54. Rademacher TW, Parekh RB, Dwek RA. Glycobiology. *Ann Rev Biochem* 1988; 57: 785–838
55. Sumitra K, Pragasaam V, Sakthivel R et al. Beneficial effect of vitamin E supplementation on the biochemical and kinetic properties of Tamm-Horsfall glycoprotein in hypertensive and hyperoxaluric patients. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 1407–1415
56. Franzin A, Heinegerd D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J* 1985; 232 (3): 715–724
57. Olberg A, Franzen A, Heidengard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83 (23): 8819–8823
58. Helfrich MH, Nesbitt SA, Dorey EL, Horton MA. Rat osteoclasts adhere to a wide range of RGD (Arg-Gly-Asp) peptide-containing proteins, including the bone sialoproteins and fibronectin, a β_3 integrin. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 335–343
59. Butler WT. Structural and functional domains of osteopontin. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 760: 6–11
60. Hu DD, Lin EC, Kovach NL et al. A biochemical characterization of the binding of osteopontin to integrins $\alpha_v\beta_1$ and $\alpha_v\beta_5$. *J Biol Chem* 1995; 270: 26232–26238
61. Liaw L, Skinner MP, Raines EW et al. The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins: Role of $\alpha_v\beta_3$ in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest* 1995; 95: 713–724
62. Weber GF, Ashkar A, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 1996; 271: 509–512
63. Sibalic V, Fan X, Loffing J, Wuthrich RP. Upregulated renal tubular CD44, hyaluronan, and osteopontin in kd kd mice with interstitial nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 1344–1353
64. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11: 279–303
65. Verhulst A, Asselman M, Persy VP et al. Crystal retention capacity of cells in the human nephron: involvement of CD44 and its ligands hyaluronic acid and osteopontin in the transition of a crystal binding – into a nonadherent epithelium. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 107–115
66. Yokosaki Y, Tanaka K, Higashikawa F et al. Distinct structural requirements for binding of the integrins $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_9\beta_1$ to osteopontin. *Matrix Biol* 2005; 24 (6): 418–427
67. Christensen B, Petersen TE, Swensen ES. Post-translational modification and proteolytic processing of urinary osteopontin. *Biochem J* 2008; 411: 53–61
68. Butler WT. The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res* 1989; 23: 123–136
69. Brown LF, Van de Water L, Papadopoulos-Sergiou A et al. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: Widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* 1992; 2: 1169–1180
70. Giachelli C, Bae N, Lombardi D et al. Molecular cloning and characterization of 2B7, a rat mRNA which distinguishes smooth muscle cell phenotypes in vitro and is identical to osteopontin (secreted phosphoprotein I, 2aR). *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177: 867–873
71. Giachelli CM, Liaw L, Murry CE et al. Osteopontin expression in cardiovascular diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 760: 109–126
72. Murry CE, Giachelli CM, Schwartz SM, Vracko R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol* 1994; 145: 1450–1462
73. Sorensen S, Justesen SJ, Johnsen AH. Identification of a macromolecular crystal growth inhibitor in human urine as osteopontin. *Urol Res* 1995; 23: 327–334
74. Min W, Shiraga H, Chalko C et al. Quantitative studies of human urinary excretion of uropontin. *Kidney Int* 1998; 53: 189–193
75. Gericke A, Qin C, Spevak L et al. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int* 2005; 77 (1): 45–54
76. Nomura S, Wills AJ, Edwards DR et al. Developmental

- expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization. *J Cell Biol* 1988; 106: 441–450
77. Patarca R, Freeman GJ, Singh RP et al. Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene: Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med* 1989; 170: 145–161
78. Shiraga H, Min W, VanDusen WJ et al. Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin: Another member of the aspartic acid-rich protein superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 426–430
79. Kohri K, Nomura S, Kitamura Y et al. Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (osteopontin). *J Biol Chem* 1993; 268 (15): 15180–15184
80. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: A protein with diverse functions. *FASEB J* 1993; 7: 1475–1482
81. Uede T, Katagiri Y, Iizuka J, Murakami M. Osteopontin, a coordinator of host defense system: A cytokine or an extracellular adhesive protein? *Microbiol Immunol* 1997; 41: 641–648
82. O'Brien EK, Garvin MR, Stewart DK et al. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1648–1656
83. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ et al. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol* 1998; 152: 353–358
84. Liaw L, Birk DE, Ballas CB et al. Altered wound healing in a mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest* 1998; 101: 1468–1478
85. Scatena M, Almeida M, Chaisson ML et al. NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol* 1998; 141: 1083–1093
86. Katagiri Y, Sleeman J, Fujii H et al. CD44 variants but not CD44s cooperate with I1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of Arg-Gly-Asp acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res* 1999; 59: 219–226
87. Ophascharoensuk V, Giachelli CM, Gorant K et al. Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney Int* 1999; 56: 571–580
88. Sodek J, Batista Da Silva AP, Zohar R. Osteopontin and mucosal protection. *J Dent Res* 2006; 85 (5): 404–415
89. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW et al. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 2001; 107: 1055–1061
90. Carlinfante G, Vassiliou D, Svensson O et al. Differential expression of osteopontin and bone sialoprotein in bone metastasis of breast and prostate carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20 (5): 437–444
91. Meller R, Stevens SL, Minami M et al. Neuroprotection by osteopontin in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25 (2): 217–225
92. Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J* 1994; 300: 723–728
93. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR et al. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 1996; 317: 59–64
94. Rittling SR, Matsumo HN, McKee MD et al. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 1101–1111
95. Boskey AL, Spevak L, Paschalis E et al. Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif Tissue Int* 2002; 71: 145–154
96. Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 156–160
97. Prince CW, Butler WT. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the biosynthesis of osteopontin, a bone-derived cell attachment protein, in clonal osteoblast-like osteosarcoma cells. *Collagen Rel Res* 1987; 7: 305–313
98. Noda M, Rodan GA. Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteoblast-like cells by parathyroid hormone. *J Biol Chem* 1989; 108: 713–718
99. Noda M, Vogel RL, Craig AM et al. Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (SPP-1 or osteopontin) gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9995–9999
100. Chang PL, Prince CW. 1 Alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 stimulates synthesis and secretion of nonphosphorylated osteopontin (secreted phosphoprotein 1) in mouse JB6 epidermal cells. *Cancer Res* 1994; 51: 2144–2150
101. Ihara H, Denhardt DT, Furuya K et al. Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin. *J Biol Chem* 2001; 276: 13065–13071
102. Niskanen LK, Suhonen M, Siitonen O et al. Aortic and lower limb artery calcification in type II (non-insulin-dependent) diabetic patients and non-diabetic control subjects: a five year follow-up study. *Atherosclerosis* 1990; 84: 61–71
103. Locker TH, Schwartz RS, Cotta CW, Hickman JR. Fluoroscopic coronary artery calcification and associated coronary disease in asymptomatic young men. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 1167–1172
104. Puentes G, Detrano R, Tang W et al. Estimation of coronary calcium mass using electron beam computed tomography: a promising approach for predicting coronary events? *Circulation* 1995; 92: 1313
105. Deneke T, Langner K, Gewe PH et al. Ossification in atherosclerotic carotid arteries. *Z Kardiol* 2001; 90 (Suppl 3): III/106–III/115
106. Olson JC, Edmundowicz D, Becker DJ et al. Coronary calcium in adults with type 1 diabetes: a stronger correlate of clinical coronary artery disease in men than in women. *Diabetes* 2000; 49: 1571–1578
107. Hirota S, Imakita M, Kohri K et al. Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. A possible association with calcification. *Am J Pathol* 1993; 143: 1003–1008
108. Ikeda T, Shirasawa T, Esaki Y et al. Osteopontin mRNA is expressed by smooth muscle-derived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta. *J Clin Invest* 1993; 92: 2814–2820
109. Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 93: 2393–2402
110. O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD et al. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* 1995; 92: 2163–2168
111. Srivatsa SS, Harry PJ, Maercklein PB et al. Increased cellular expression of matrix proteins that regulate mineralization is associated with calcification of native human and porcine xenograft bioprosthetic heart valves. *J Clin Invest* 1997; 99: 996–1009
112. Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res* 1999; 84: 166–178
113. Chen J, Singh K, Mukherjee BB, Sodek J. Developmental expression of osteopontin (OPN) mRNA in rat tissues: Evidence for a role for OPN in bone formation and resorption. *Matrix* 1993; 13: 113–123
114. Madsen KM, Zhang L., Abu Shamat AR et al. Ultrastructural localization of osteopontin in the kidney: Induction by lipopolysaccharide. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1043–1053
115. Rogers SA, Padanilam BJ, Hruska KA et al. Metanephric osteopontin regulates nephrogenesis in vitro. *Am J Physiol* 1997; 272: F469–F476
116. Giachelli CM, Pichler R, Lombardi D et al. Osteopontin expression in angiotensin II-induced tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int* 1994; 45: 515–524

117. Pichler RH, Giachelli CM, Lombardi D et al. Tubulointerstitial disease in glomerulonephritis: Potential role of osteopontin (uropontin). *Am J Pathol* 1994; 144: 915–926
118. Pichler RH, Franceschini N, Young BA et al. Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: Roles of angiotensin II and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 1186–1196
119. Magil AB, Pichler RH, Johnson RJ. Osteopontin in chronic puromycin aminonucleoside nephrosis. *J Am Soc Nephrol* 1997; 18: 1383–1390
120. Lopez CA, Hoyer JR, Wilson PD et al. Heterogeneity of osteopontin expression among nephrons in mouse kidneys and enhanced expression in sclerotic glomeruli. *Lab Invest* 1993; 69: 355–363
121. Kleinman JG, Beshensky A, Worcester EM, Brown D. Expression of osteopontin, a urinary inhibitor of stone mineral crystal growth, in rat kidney. *Kidney Int* 1995; 47: 1585–1596
122. Hudkins KL, Giachelli CM, Cui Y et al. Osteopontin expression in fetal and mature human kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 444–457
123. Worcester EM, Blumenthal SS, Beshensky AM, Lewand DL. The calcium oxalate crystal growth inhibitor protein produced by mouse kidney cortical cells in culture is osteopontin. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1029–1036
124. Hoyer JP, Otvos L Jr, Urge L. Osteopontin in urinary stone formation. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 760: 257–265
125. Worcester EM, Beshensky AM. Osteopontin inhibits nucleation of calcium oxalate crystals. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 760: 375–377
126. Wesson JA, Worcester EM, Weissner JH et al. Control of calcium oxalate crystal structure and cell adherence by urinary macromolecules. *Kidney Int* 1998; 53: 952–957
127. Umekawa T. Structural characteristics of osteopontin for calcium oxalate crystal. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1999; 90 (3): 436–444
128. Asplin JR, Arsenault D, Parks JH et al. Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization. *Kidney Int* 1998; 53: 194–199
129. Lieske JC, Leonard R, Toback FG. Adhesion of calcium oxalate monohydrate crystals to renal epithelial cells is inhibited by specific anions. *Am J Physiol* 1995; 268: F604–F612
130. Lieske JC, Hammes MS, Hoyer JR, Toback FG. Renal cell osteopontin production is stimulated by calcium oxalate monohydrate crystals. *Kidney Int* 1997; 51: 679–686
131. Gokhale JA, Glenton PA, Khan SR. Localization of Tamm-Horsfall protein and osteopontin in a rat nephrolithiasis model. *Nephron* 1996; 73: 456–461
132. Jiang XJ, Feng T, Chang LS et al. Expression of osteopontin mRNA in normal and stone-forming rat kidney. *Urol Res* 1998; 26: 389–394
133. Yagisawa T, Chandhoke S, Fan J, Lucia S. Renal osteopontin expression in experimental urolithiasis. *J Endourol* 1998; 12: 171–176
134. Yasui T, Fujita K, Sasaki S et al. Expression of bone matrix proteins in urolithiasis model rats. *Urol Res* 1999; 27: 255–261
135. Beshensky AM, Wesson JA, Kleinman JG et al. Renoprotective modulation of calcium oxalate crystal structure by osteopontin in vivo. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 558A
136. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V et al. Osteopontin – A molecule for all seasons. *QJM* 2002; 95 (1): 3–13
137. Wesson JA, Johnson RJ, Mazzali M et al. Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 139–147
138. Mo L, Liaw L, Evan AP et al. Renal calcinosis and stone formation in mice lacking osteopontin, Tamm-Horsfall protein, or both. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293: F1935–F1943
139. Yasui T, Fujita K, Hayashi Y et al. Quantification of osteopontin in the urine of healthy and stone-forming men. *Urol Res* 1999; 27: 225–230
140. Nishio S, Hatanaka M, Takeda H et al. Calcium phosphate crystal-associated proteins: alpha2-HS-glycoprotein, prothrombin F1, and osteopontin. *Mol Urol* 2000; 4: 383–390
141. Huang HS, Ma MC, Chen CF, Chen J. Lipid peroxidation and its correlations with urinary levels of oxalate, citric acid, and osteopontin in patients with renal calcium oxalate stones. *Urology* 2003; 62 (6): 1123–1128
142. Tsuji H, Tohru U, Hirotsugu U et al. Urinary concentration of osteopontin and association with urinary supersaturation and crystal formation. *Int J Urol* 2007; 14 (7): 630–634
143. Bautista DS, Denstedt J, Chambers AF, Harris JF. Low-molecular-weight variants of osteopontin generated by serine proteinases in urine of patients with kidney stones. *J Cell Biochem* 1996; 61: 402–409
144. Hedgepeth RC, Yang L, Resnick MI, Marengo SR. Expression of proteins that inhibit calcium oxalate crystallization in vitro in the urine of normal and stone-forming individuals. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 104–112
145. Kleinman LG, Wesson JA, Hughes J. Osteopontin and calcium stone formation. *Nephron Physiol* 2004; 98: 43–47
146. Yamate T, Tsuji H, Amasaki N et al. Analysis of osteopontin DNA in patients with urolithiasis. *Urol Res* 2000; 28: 159–166
147. Gao B, Yasui T, Okada A et al. A polymorphism of the osteopontin gene is related to urinary calcium stones. *J Urol* 2005; 174: 1472–1476
148. Christensen B, Kazanecki CC, Petersen TE et al. Cell type-specific post-translational modifications of mouse osteopontin are associated with different adhesive properties. *J Biol Chem* 2007; 282 (27): 19463–19472
149. Addadi L., Weiner S. Interactions between acidic proteins and crystals: Stereochemical requirements in biomineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4110–4114
150. Wesson JA, Worcester E. Formation of hydrated calcium oxalate in the presence of poly-L-aspartic acid. *Scanning Microsc* 1996; 10: 415–424
151. Beshensky AM, Wesson JA, Worcester EM et al. Effects of urinary macromolecules on hydroxyapatite crystal formation. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2108–2116
152. Jung T, Sheng X, Choi CK et al. Probing crystallization of calcium oxalate monohydrate and the role of macromolecule additives with in situ atomic force microscopy. *Langmuir* 2004; 20: 8587–8596
153. Taller A, Grohe B, Rogers KA et al. Specific adsorption of osteopontin and synthetic polypeptides to calcium oxalate monohydrate crystals. *Biophys J* 2007; 93 (5): 1768–1777
154. Kohri K, Suzuki Y, Yoshida K et al. Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding urinary stone protein, which is identical to osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 184: 859–864
155. Yamate T, Kohri K, Umekawa T et al. The effect of osteopontin on the adhesion of calcium oxalate crystals to Madin-Darby canine kidney cells. *Eur Urol* 1996; 30: 388–393
156. Yamate T, Kohri K, Umekawa T et al. Interaction between osteopontin on Madin-Darby canine kidney cell membrane and calcium oxalate crystal. *Urol Res* 1999; 62: 81–86
157. Konya E, Umekawa T, Iguchi M, Kurita T. The role of osteopontin on calcium oxalate crystal formation. *Eur Urol* 2003; 43 (5): 564–571
158. Yasui T, Fujita K, Asai K, Kohri K. Osteopontin regulates adhesion of calcium oxalate crystals to renal epithelial cells. *Int J Urol* 2002; 9 (2): 100–108
159. Okada A, Nomura S, Saeki Y et al. Morphological conversion of calcium oxalate crystals into stones is regulated by osteopontin in mouse kidney. *J Bone Miner Res* 2008; 23 (10): 1629–1637
160. Swensen ES, Hujrur P, Petersen TE. Posttranslational modifications of bovine osteopontin: identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites. *Protein Sci* 1995; 4: 2040–2049
161. Christensen B, Nielsen MS, Haselmann KF et al. Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters: identification of 36 phosphorylated and five O-glycosylation sites and their biological implications. *Biochem J* 2005; 390: 285–292

162. Keykhosravani M, Doherty-Kirby A, Zhang C et al. Comprehensive identification of post-translational modifications of rat bone osteopontin by mass spectrometry. *Biochemistry* 2005; 44: 6990–7003
163. Boskey AL, Maresca M, Ullrich W et al. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: Inhibition of hydroxyapatite formation and growth in gelatin-gel. *Bone Miner* 1993; 22: 147–159
164. Boskey AL. Osteopontin and related phosphorylated sialoproteins: effects on mineralization. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 760: 249–256
165. Goldberg HA, Warner KJ, Li MC, Hunter GK. Binding of bone sialoprotein, osteopontin and synthetic polypeptides to hydroxyapatite. *Connect Tissue Res* 2001; 42: 25–37
166. Hoyer JR, Asplin JR, Otvos L. Phosphorylated osteopontin peptides suppress crystallization by inhibiting the growth of calcium oxalate crystals. *Kidney Int* 2001; 60: 77–82
167. Steitz SA, Speer MY, McKee MD et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol* 2002; 161 (6): 2035–2046
168. Chen Y, Bal BS, Gorski JP. Calcium and collagen binding properties of osteopontin, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. *J Biol Chem* 1992; 276: 24871–24878
169. Coe FL, Boyce WH, Friedman GD et al. Prevention and treatment of kidney stones. *J Urol* 1989; 141: 804–808
170. Sheng X, Ward MD, Wesson JA. Crystal surface adhesion explains the pathological activity of calcium oxalate hydrates in kidney stone formation. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16 (7): 1904–1908
171. Ryall RL, Chauvet MC, Grover PK. Intracrystalline proteins and urolithiasis: a comparison of the protein content and ultrastructure of urinary calcium oxalate monohydrate and dihydrate crystals. *BJU International* 2005; 96 (4): 654–663
172. Falini G, Albeck S, Weiner S, Addadi L. Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science* 1996; 271: 67–69
173. Жариков АЮ, Зверев ЯФ, Брюханов ВМ, Лампатов ВВ. Современные представления о модуляторах оксалатного нефролитиаза. I. Стимуляторы камнеобразования. *Нефрология* 2009; 13 (1): 56–72
174. Tomazie BB, Nancollas GH. The kinetics of dissolution of calcium oxalate hydrates II. The dihydrate. *Invest Urol* 1980; 18: 97–101
175. Lepage L, Tawashi R. Growth and characterization of calcium oxalate dihydrate crystals (weddelite). *J Pharm Sci* 1982; 71: 1059–1062
176. Wiessner JH, Mandel GS, Mandel NS. Membrane interactions with calcium oxalate crystals: variation in haemolytic potentials with crystal morphology. *J Urol* 1986; 135: 835–839
177. Wiessner JH, Hung LY, Mandel NS. Crystal attachment to injured renal collecting duct cells. Influence of urine proteins and pH. *Kidney Int* 2003; 63: 1313–1320
178. Ryall RL, Fleming DE, Grover PK et al. The hole truth. Intracrystalline proteins and calcium oxalate kidney stones. *Mol Urol* 2000; 4: 391–402
179. Ryall RL, Fleming DE, Doyle IR et al. Intracrystalline proteins and the hidden ultrastructure of calcium oxalate urinary crystals: Implications for kidney stone formation. *J Struct Biol* 2001; 134: 5–14
180. Fleming DE, van Riessen A, Chauvet MC et al. Intracrystalline proteins and urolithiasis: a synchrotron X-ray diffraction study of calcium oxalate monohydrate. *J Bone Min Res* 2003; 18: 1282–1291
181. Canales BK, Anderson L, Higgins L et al. Second prize: Comprehensive proteomic analysis of human calcium oxalate monohydrate kidney stone matrix. *J Endourol* 2008; 22 (6): 1161–1167
182. Merchant ML, Cummins TD, Wilkey DW et al. Proteomic analysis of renal calculi indicates an important role for inflammatory processes in calcium stone formation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: F1254–F1258
183. Hoyer JR. Uropontin in urinary calcium stone formation. *Miner Electrolyte Metab* 1995; 20: 385–392
184. Atmani F, Opalko FJ, Khan SR. Association of urinary macromolecules with calcium oxalate crystals induced in vitro in normal human and rat urine. *Urol Res* 1996; 24: 45–50
185. Webber D, Rodgers AL, Sturrock ED. Selective inclusion of proteins into urinary calcium oxalate crystals: comparison between stone-prone and stone-free population groups. *J Cryst Growth* 2003; 259: 179–189
186. Chauvet MC, Ryall RL. Intracrystalline proteins and calcium oxalate crystal degradation in MDCK II cells. *J Struct Biol* 2005; 151: 12–17
187. Grover PK, Thurgood LA, Fleming DE et al. Intracrystalline urinary proteins facilitate degradation and dissolution of calcium oxalate crystals in cultured renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294: F355–F361
188. Le Hir M, Dubach UC, Schmidt U. Quantitative distribution of lysosomal hydrolases in the rat nephron. *Histochemistry* 1979; 63: 245–251
189. Khan SR, Shevock PN, Hackett RL. Urinary enzymes and calcium oxalate urolithiasis. *J Urol* 1989; 142: 846–849
190. Singh AK. Presence of lysosomal enzymes in the normal glomerular basement membrane matrix. *Histochem J* 1993; 25: 562–568
191. Kudo S, Miyamoto G, Kawano K. Proteases involved in the metabolic degradation of human interleukin-11 by rat kidney lysosomes. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 361–367
192. de Bruijn WC, Boeve ER, van Run PR et al. Etiology of experimental calcium oxalate monohydrate nephrolithiasis in rats. *Scanning Micr Int* 1994; 8: 541–550
193. de Water R, Nordermeer C, van der Kwast TH et al. Calcium oxalate nephrolithiasis: effect of renal crystal deposition on the cellular composition of the renal interstitium. *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 761–771
194. de Water R, Nordemeer C, Houtsmuller AS et al. Role of macrophages in nephrolithiasis in rats: an analysis of the renal interstitium. *Am J Kidney Dis* 2000; 36: 615–625
195. Khan SR, Byer KJ, Thamilselvan S et al. Crystal-cell interaction and apoptosis in oxalate-associated injury of renal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: S457–S463
196. Umekawa T, Chegini N, Khan SR. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by renal epithelial cell in culture on exposure to calcium oxalate, phosphate and uric acid crystals. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 664–669
197. Khan SR, Shevock PN, Hackett RL. Acute hyperoxaluria, renal injury and calcium oxalate urolithiasis. *J Urol* 1992; 147: 226–230
198. Lieske JC, Deganello S, Toback GF. Cell-crystal interactions and kidney stone formation. *Nephron* 1999; 81 (Suppl 1): 8–17
199. Тиктинский ОЛ, Александров ВП. *Мочекаменная болезнь*. СПб: Питер, 2000; 29–30
200. Steinbuch M, Loeb J. Isolation of an α 2-globulin from human plasma. *Nature* 1961; 192: 1196
201. Heide K, Heimburger N, Haupt H. An inter- α -trypsin inhibitor of human serum. *Clin Chim Acta* 1965; 11: 82–85
202. Fries E, Kaczmarczyk A. Inter- α -inhibitor, hyaluronan and inflammation. *Acta Biochim Pol* 2003; 50 (3): 735–742
203. Chen L, Mao SJT, Larsen WJ. Identification of a factor in fetal bovine serum that stabilizes the cumulus extracellular matrix, a role for member of the inter-alpha-inhibitor family. *J Biol Chem* 1992; 267: 12380–12386
204. Balduyck M, Laroui S, Mizon C, Mizon J. A proteoglycan related to the urinary trypsin inhibitor. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1989; 370: 331–336
205. Enghild JJ, Thogersen IB, Pizzo SV, Salvesen G. Analysis of inter-alpha-trypsin inhibitor and a novel trypsin inhibitor, pre-alpha-trypsin inhibitor, from human plasma: Polypeptide chain stoichiometry and assembly by glycan. *J Biol Chem* 1989; 264: 15975–15981
206. Malki N, Balduyck M, Maes P et al. The heavy chains of human plasma inter-alpha-trypsin inhibitor: Their isolation, their identification by electrophoresis and partial sequencing. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1992; 373: 1009–1018
207. Rouet P, Raguenez G, Tronche F et al. A potent enhancer

- made of clustered liver specific elements in the transcription control sequences of human alpha1-microglobulin/bikunin gene. *J Biol Chem* 1992; 267: 20765–20773
208. Hochstrasser K, Bretzel G, Feuth H et al. The inter- α -trypsin inhibitor as precursor of the acid-stable protease inhibitors in human serum and urine. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1976; 357: 153–162
209. Dietl T, Dobrinski W, Hochstrasser K. Human inter- α -trypsin inhibitor: Limited proteolysis by trypsin, plasmin, kallikrein, and granulocytic elastase and inhibitory properties of the cleavage products. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1979; 360: 1313–1318
210. Potempa J, Kwon K, Chawla R, Travis J. Inter- α -trypsin inhibitor: Inhibition spectrum of native and derived forms. *J Biol Chem* 1989; 264: 15109–15114
211. Salier JP. α -trypsin inhibitor: Emergence of a family within the Kunitz-type protease inhibitor superfamily. *Trends Biochem Sci* 1990; 15: 435–439
212. Xu Y, Carr PD, Guss JM, Ollis DL. The crystal structure of bikunin from inter-alpha-inhibitor complex: a serine protease inhibitor with two Kunitz domains. *J Mol Biol* 1998; 276 (5): 955–966
213. Freis E, Blom AM. Bikunin – not just a plasma proteinase inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32 (2): 125–137
214. Pugia MJ, Valdes RJ, Jortani SA. Bikunin (urinary trypsin inhibitor): structure, biological relevance, and measurement. *Adv Clin Chem* 2007; 44: 223–245
215. Wachter E, Hochstrasser K. Kunitz-type proteinase inhibitors derived by limited proteolysis of the inter- α -trypsin inhibitor, IY: the amino acid sequence of the human urinary trypsin inhibitor isolated by affinity chromatography. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1981; 362: 1351–1355
216. Kanayama N, El Maradney E, Halim A et al. Urinary trypsin inhibitor prevents uterine muscle contraction by inhibition of Ca⁺⁺ influx. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 192–199
217. Kanayama N, Halim A, Maehara K et al. Kunitz-type trypsin inhibitor prevents LPS-induced increase of cytosolic free Ca²⁺ in human neutrophils and HUVEC cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 207: 324–330
218. Maehara K, Kanayama N, Halim A et al. Down-regulation of interleukin-8 gene expression in HL60 cell line by human Kunitz-type trypsin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206: 927–934
219. Zhuo L, Salustri A, Kimata K. A physiological function of serum proteoglycan bikunin: the chondroitin sulfate moiety plays a central role. *Glycoconj J* 2002; 19 (4-5): 241–247
220. Atmani F, Lacour B, Drueke T, Daudon M. Isolation and purification of a new glycoprotein from human urine inhibiting calcium oxalate crystallization. *Urol Res* 1993; 21: 61–66
221. Bratt T, Olsson H, Sjöberg EM et al. Cleavage of the α 1-microglobulin-bikunin precursor is localized to the Golgi apparatus of rat liver cells. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1157: 147–154
222. Atmani F, Khan SR. Characterization of uronic-acid-rich inhibitor of calcium oxalate crystallization isolated from rat urine. *Urol Res* 1995; 23: 95–101
223. Tang Y, Grover PK, Moritz RL et al. Is nephrocalcin related to the urinary derivative (bikunin) of inter-alpha-trypsin inhibitor? *Br J Urol* 1995; 75: 425–430
224. Atmani F, Lacour B, Jungers P et al. Molecular characteristics of uronic-acid-rich protein, a strong inhibitor of calcium oxalate crystallization in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 1158–1165
225. Atmani F, Lacour B, Jungers P et al. Reduced inhibitory activity of uronic-acid-rich protein in urine of stone formers. 1994; 22: 257–260
226. Swensen S, Hansen K, Bak S, Justesen SJ. An unidentified macromolecular inhibitory constituent of calcium oxalate crystal growth in human urine. *Urol Res* 1990; 18: 373–379
227. Atmani F, Mizon J, Khan SR. Identification of uronic-acid-rich protein as urinary bikunin the light chain of inter- α -inhibitor. *Eur J Biochem* 1996; 236: 984–990
228. Iida S, Peck AB, Johnson-Tardieu J et al. Temporal changes in mRNA expression for bikunin in the kidneys of rats during calcium oxalate nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 986–996
229. Khan SR. Crystal-induced inflammation of the kidneys: results from human studies, animal models, and tissue-culture studies. *Clin Exp Nephrol* 2004; 8 (2): 75–88
230. Khan SR. Renal tubular damage/dysfunction: key to the formation of kidney stones. *Urol Res* 2006; 34 (2): 86–91
231. Grewal JC, Tsai JY, Khan SR. Oxalate-inducible AMBP gene and its regulatory mechanism in renal tubular epithelial cells. *Biochem J* 2005; 387 (Pt 3): 609–616
232. Iida S, Johnson-Tardieu J, Glenton P et al. Molecular detection of bikunin in normal and oxalate-exposed kidneys and renal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 563A
233. Atmani F, Glenton PA, Khan SR. Role of inter-alpha-inhibitor and its related proteins in experimentally induced calcium oxalate urolithiasis. Localization of proteins and expression of bikunin gene in the rat kidney. *Urol Res* 1999; 27 (1): 63–67
234. Moriyama MT, Glenton PA, Khan SR. Expression of inter-alpha-inhibitor related proteins in kidneys and urine of hyperoxaluric rats. *J Urol* 2001; 165 (5): 1687–1692
235. Okuyama M, Yamaguchi S, Yachiku S. Identification of bikunin isolated from human urine inhibits calcium oxalate crystal growth and its localization in the kidneys. *Int J Urol* 2003; 10 (10): 530–535
236. Atmani F, Mizon J, Khan SR. Inter- α -inhibitor: a protein family involved in the inhibition of calcium oxalate crystallization. *Scanning Microsc* 1996; 10: 425–433
237. Atmani F, Khan SR. Inter- α -inhibitor, another serum protein with potential involvement in calcium oxalate nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 1798A
238. Ebisuno S, Nishihata M, Inagaki T et al. Bikunin prevents adhesion of calcium oxalate crystal to renal tubular cells in human urine. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 (Suppl 14): S436–S440
239. Mïddïtognon-Benissan J, Tardivel S, Hennequin C et al. Inhibitory effect of bikunin on calcium oxalate crystallization in vitro and urinary bikunin decrease in renal stone formers. *Urol Res* 1999; 27 (1): 69–75
240. Atmani F, Khan SR. Role of urinary bikunin in the inhibition of calcium oxalate crystallization. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: S385–S388
241. Kobayashi H, Shibata K, Fujie M et al. Identification of structural domains in inter- α -trypsin inhibitor involved in calcium oxalate crystallization. *Kidney Int* 1998; 53: 1727–1735
242. Marengo SR, Resnick MI, Yang L, Chung JY. Differential expression of urinary inter-alpha-trypsin inhibitor trimers and dimers in normal compare to active calcium oxalate stone forming men. *J Urol* 1998; 159 (5): 1444–1450
243. Evan AP, Bledsoe S, Worcester EM et al. Renal inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3 increases in calcium oxalate stone-forming patients. *Kidney Int* 2007; 72 (12): 1503–1511
244. Suzuki M, Kobayashi H, Kageyama S et al. Excretion of bikunin and its fragments in the urine of patients with renal stones. *J Urol* 2001; 166 (1): 268–274
245. Moczydlowski E, Moss GW, Lucchesi KJ. Bovine pancreatic trypsin inhibitor as a probe of large conductance Ca(2+)-activated K+ channels at an internal site of interaction. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 21–28
246. Stapleton AM, Ryall RL. Crystal matrix protein—getting blood out of a stone. *Miner Electrolyte Metab* 1994; 20 (6): 399–409
247. Stapleton AM, Simpson RJ, Ryall RL. Crystal matrix protein is related to human prothrombin. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195 (3): 1199–1203
248. Suzuki K, Moriyama M, Nakajima C et al. Isolation and partial characterization of crystal matrix protein as a potent inhibitor of calcium oxalate crystal aggregation: evidence of activation peptide of human prothrombin. *Urol Res* 1994; 22 (1): 45–50
249. Stapleton AM, Ryall RL. Blood coagulation proteins and urolithiasis are linked: crystal matrix protein is the F1

- activation peptide of human prothrombin. *Br J Urol* 1995; 75 (6): 712–719
250. Stapleton AM, Dawson CJ, Grover PK et al. Further evidence linking urolithiasis and blood coagulation: urinary prothrombin fragment 1 is present in stone matrix. *Kidney Int* 1996; 49 (3): 880–888
251. Grover PK, Thurgood LA, Ryall RL. Effect of urine fractionation on attachment of calcium oxalate crystals to renal epithelial cells: implications for studying renal calculogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292 (5): F1396–F1403
252. Atmani F, Glenton PA, Khan SR. Identification of proteins extracted from calcium oxalate and calcium phosphate crystals induced in the urine of healthy and stone forming subjects. *Urol Res* 1998; 26 (3): 201–207
253. Ryall RL. Glycosaminoglycans, proteins, and stone formation: adult themes and child's play. *Pediatr Nephrol* 1996; 10 (5): 656–666
254. Ryall RL, Grover PK, Stapleton AM et al. The urinary F1 activation peptide of human prothrombin is a potent inhibitor of calcium oxalate crystallization in undiluted human urine in vitro. *Clin Sci (Lond)* 1995; 89 (5): 533–541
255. Grover PK, Ryall RL. Inhibition of calcium oxalate crystal growth and aggregation by prothrombin and its fragments in vitro: relationship between protein structure and inhibitory activity. *Eur J Biochem* 1999; 263 (1): 50–56
256. Grover PK, Ryall RL. Effect of prothrombin and its activation fragments on calcium oxalate crystal growth and aggregation in undiluted human urine in vitro: relationship between protein structure and inhibitory activity. *Clin Sci (Lond)* 2002; 102 (4): 425–434
257. Walton RC, Kavanagh JP, Heywood BR, Rao PN. The association of different urinary proteins with calcium oxalate hydromorphs. Evidence for non-specific interactions. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1723 (1-3): 175–183
258. Gul A, Rez P. Models for protein binding to calcium oxalate surfaces. *Urol Res* 2007; 35 (2): 63–71
259. Webber D, Rodgers AL, Sturrock ED. Synergism between urinary prothrombin fragment 1 and urine: a comparison of inhibitory activities in stone-prone and stone-free population groups. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40 (9): 930–936
260. Webber D, Radcliffe CM, Royle L et al. Sialylation of urinary prothrombin fragment 1 is implicated as a contributory factor in the risk of calcium oxalate kidney stone formation. *FEBS J* 2006; 273 (13): 3024–3037
261. Webber D, Rodgers AL, Sturrock ED. Glycosylation of prothrombin fragment 1 governs calcium oxalate crystal nucleation and aggregation, but not crystal growth. *Urol Res* 2007; 35 (6): 277–285
262. Buchholz NP, Kim DS, Grover PK et al. The effect of warfarin therapy on the charge properties of urinary prothrombin fragment 1 and crystallization of calcium oxalate in undiluted human urine. *J Bone Miner Res* 1999; 14 (6): 1003–1012
263. Wadelius M, Pirmohamed M. Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges. *Pharmacogenomics J* 2007; 7 (2): 99–111
264. Stapleton AM, Timme TL, Ryall RL. Gene expression of prothrombin in the human kidney and its potential relevance to kidney stone disease. *Br J Urol* 1998; 81 (5): 666–671
265. Grover PK, Miyazawa K, Coleman M et al. Renal prothrombin mRNA is significantly decreased in a hyperoxaluric rat model of nephrolithiasis. *J Pathol* 2006; 210 (3): 273–281
266. Hof M, Fleming GR, Fidler V. Time-resolved fluorescence study of a calcium-induced conformational change in prothrombin fragment 1. *Proteins* 1996; 24 (4): 485–494
267. Li L, Darden T, Hiskey R, Pedersen LG. Computational studies of human prothrombin fragment 1, the Gla domain of factor IX and several biological interesting mutants. *Haemostasis* 1996; 26 (1): 54–59

Поступила в редакцию 03.08.2009 г.

Принята в печать 02.03.2010 г.