© Коллектив авторов, 2001
УДК 616.613-007.7-092:616.632-07-053.2/.5

Н.А.Лисовая, Л.А.Носкин, В.Л.Эмануэль, А.В.Папаян, Г.Д.Комаров

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ МЕХАНИЗМОВ КАМНЕОБРАЗОВАНИЯ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСНОГО ИЗУЧЕНИЯ СУБФРАКЦИОННОГО СОСТАВА, ОСМОЛЯЛЬНОСТИ И КРИСТАЛЛИЗАЦИИ СОЛЕЙ МОЧИ У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ПОЧЕК

N.A.Lisovaya, L.A.Noskin, V.L.Emanuel, A.V.Papayan, G.D.Komarov

DIFFERENTIATION OF CALCULOGENESIS MECHANISMS BY THE COMPLEX STUDY OF URINE SUBFRACTIONAL STRUCTURE, OSMOLALITY AND CRYSTALLIZATION OF URINE SALTS IN CHILDREN WITH DIFFERENT RENAL DISEASES

Кафедры детских болезней № 2 с курсом нефрологии факультета усовершенствования врачей Санкт-Петербургской государственной педиатрической медицинской академии, клинической лабораторной диагностики с курсом метрологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, Санкт-Петербургский институт ядерной физики РАН; Госсанэпиднадзор, Москва, Россия

РЕФЕРАТ

Метод лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) основан на определении гидродинамических размеров светорассеивающих частиц, что позволяет регистрировать субфракционный состав любых биологических жидкостей.

Целью настоящего исследования явилось изучение субфракционного состава мочи, определяемого методом ЛКС, до и после осаждения Тамм—Хорсфалл протеина (ТХП) 0,58 М раствором NaCl в зависимости от величины осмоляльности мочи и наличия процесса камнеобразования, определяемого с помощью системы ЛИТОС. Обследованы 120 детей с различной почечной патологией и 46 детей контрольной группы.

Выявлено, что природа высокомолекулярных субфракций мочи (от 200 до 600 нм и более 600 нм), регистрируемых методом ЛКС, представлена преимущественно белком Тамма—Хорсфалла и зависит от изменения его физико-химических свойств.

Повышение осмоляльности мочи у здоровых детей и большинства пациентов с кристаллуриями сопровождалось увеличением встречаемости активного процесса камнеобразования и содержания высокомолекулярных частиц (200–600 нм и более) в ЛК-спектрах мочи. По-видимому, по мере концентрирования мочи происходит полимеризация ТХП, что увеличивает вероятность камнеобразования. Повышение осмоляльности мочи у больных с мочекаменной болезнью (МКБ) сопровождалось увеличением встречаемости активного процесса камнеобразования и накоплением в спектре низкомолекулярных частиц (до 75 нм). В то же время увеличение в спектре крупномолекулярных частиц при МКБ и пиелонефрите отмечалось при более низкой осмоляльности мочи (ниже 600 ммоль/кг H_2O), что может быть связано с изменением структуры самого ТХП и полимеризацией его при низкой концентрации мочи.

Одновременное определение субфракционного состава, осмоляльности мочи и процессов кристаллизации по системе ЛИТОС позволяет дифференцировать механизмы камнеобразования на основе изменений физико-химических свойств основных уропротеинов.

Ключевые слова: мочекаменная болезнь, Тамм—Хорсфалл протеин, лазерная корреляционная спектроскопия.

ABSTRACT

The Laser Correlation Spectroscopy (LCS) technique is based on the determination of hydrodynamic sizes of light scattering corpuscles that allows the subfractional structure of any biological fluid to be recorded. The purpose of the present research was to study the urine subfractional structure determined by LCS before and after precipitation of Tamm-Horsfall Protein (THP) in 0,58 M solution of NaCl depending on urine osmolality and calculogenesis process determined by LITOS system. Under examination there were 120 children with different renal diseases and 46 children of the control group. It has been found that the nature of high-molecular subfractions of urine (from 201 to 600 nm and more than 600 nm) recorded by LCS is mainly represented by THP and depends on the change of its physico-chemical properties.

An increase of urine osmolality in healthy children and in the majority of patients with crystalluria was accompanied both by increased frequency of the active process of calculogenesis and content of high-molecular particles (201–600 nm and more) in LC spectrum. Polymerization of THP seems to occur during the process of urine concentration which increases the probability of calculogenesis. An increase of urine osmolality in patients with urolithiasis was accompanied by increased frequency of active process of calculogenesis and accumulation of low-molecular particles (up to 75 nm) in the spectrum. At the same time the increased number of high-molecular particles in the spectrum both in urolithiasis and in pyelonephritis was noted as a lower urine osmolality (below 600 mmol/kg H_2O) that can be associated with a change in the structure of THP itself and its polymerization at low urine concentration.

The simultaneous determination of urine subfractional content, urine osmolality and processes of crystallization by LITOS system allows to differentiate the mechanisms of calculogenesis on the basis of changes in physico-chemical properties of the main uroproteins.

Key words: urolithiasis, Tamm-Horsfall protein, laser correlation spectroscopy, children.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на интенсивные исследования патогенеза мочекаменной болезни (МКБ) до сих пор механизмы камнеобразования остаются не известными. Многочисленные теории объясняют лишь отдельные звенья в большой цепи факторов, приводящих к формированию конкрементов в мочевых путях [1]. Количественно преобладающим белком нормальной мочи является гликопротеин Тамма—Хорсфалла, который остается в растворе сульфасалициловой кислоты, но осаждается 0,58 М раствором NaCl [3]. Особенностью гликопротеина является его высокая склонность к полимеризации при повышении концентрации электролитов и снижении pH внутриканальцевой жидкости [8, 21]. Известно, что Тамм—Хорсфалл протеин (ТХП) является основным компонентом мочевых цилиндров [20], участвует в патогенезе острой почечной недостаточности [19] и служит естественным механизмом защиты против инфицирования мочевого тракта [18, 22]. Важная роль принадлежит белку в процессах кристаллизации и образования камней мочевой системы. При этом ТХП может действовать и как промотор, и как ингибитор кристаллизации оксалата кальция [10, 15, 24], а его функция в литогенезе определяется не столько величиной экскреции, сколько структурными изменениями молекулы белка [7, 12, 13].

Метод лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) основан на определении гидродинамических размеров светорассеивающих частиц, что позволяет регистрировать субфракционный состав любых биологических жидкостей [2]. Чувствительность его относительно белковых компонентов составляет менее 1 мкг/мл, что достаточно для идентификации белковых ингредиентов даже в слезной жидкости [5] и конденсате влаги выдыхаемого воздуха [4]. Поэтому с помощью ЛКС регистрируются различные белковые составляющие мочи, которая на основе любых других методов считается свободной от белка. В свою очередь, благодаря появлению системы ЛИТОС, диагностика процесса камнеобразования стала возможной задолго до формирования мочевых конкрементов [6].

Целью настоящего исследование явилось изучение субфракционного состава мочи, регистрируемого методом ЛКС, до и после осаждения белка Тамма—Хорсфалла 0,58 М раствором NaCl в зависимости от величины осмоляльности мочи и наличия процесса камнеобразования, определяемого с помощью системы ЛИТОС.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование мочи по системе ЛИТОС и методом ЛКС проведено у 75 детей с кристаллуриями (43 девочки и 32 мальчика в возрасте от 3 до 15 лет), причем у 22 из них повторно в динамике наблюдения; у 26 детей с мочекаменной болезнью (13 девочек и 13 мальчиков от 6 до 16 лет), у 20 больных в активную фазу пиелонефрита (15 девочек и 5 мальчиков от 2 до 14 лет); 46 детей (21 девочка и 32 мальчика в возрасте от 11 мес до 12 лет) составили контрольную группу.

Из утренней порции мочи, собранной по общим правилам, в пробирку отливали 10 мл и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 мин. Затем 1 мл надосадка отбирали в стерильные пластиковые пробирки типа «Эппендорф», замораживали при температуре −20°С и хранили до момента исследования. Для осаждения белка Тамма—Хорсфалла к 10 мл предварительно отцентрифугированной (2000 об/мин в течение 30 мин) той же утренней мочи добавляли 339 мг кристаллического NaCl (до получения окончательной концентрации 0,58 моль/л) и оставляли при температуре 4°С на 48 ч. Затем образцы центрифугировали при 7000 g в течение 30 мин и 1 мл надосадка помещали в пластиковые пробирки типа «Эппендорф», замораживали при температуре −20°С. Перед исследованием образцы размораживали в термостате при 37°С в течение 30 мин и повторно центрифугировали в течение 15 мин при 5000 об/мин. Затем пробы в объеме 200 мкл помещали в кювету ЛКС спектрометра (ЛКС-03-«ИНТОКС») и проводили измерение в количестве 1000 на-

коплений при частоте 8192 Гц. Регуляризацию спектра проводили с использованием нелинейной шкалы. Соответствие спектра той или иной дискретной семиотической группе устанавливали с помощью программы «Mch», прилагаемой к прибору.

Исследование мочи по системе ЛИТОС проводили согласно комплексной методике диагностики уролитиаза, названной «Системой ЛИТОС» [6]. Наличие в образце мочи краевой белковой зоны, свободной от кристаллов солей, оценивали как отрицательный результат — отсутствие процесса камнеобразования. В зависимости от интенсивности кристаллизации солей в периферической белковой зоне тест-образца высушенной капли мочи оценивали степень активности камнеобразования: высокую (III), умеренную (II) или слабую (I) степени. Осмоляльность мочи определяли криоскопическим методом на миллиосмометре МТ-2 («Буревестник», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для анализа субфракционного состава мочи были выделены четыре информативные зоны: I — зона низкомолекулярных ингредиентов (от 1 до 50 нм); II — зона среднемолекулярных ингредиентов (от 51 до 200 нм); III — зона высокомолекулярных ингредиентов (от 201 до 600 нм) и зона сверхвысокомолекулярных частиц (выше 600 нм). В зависимости от увеличения процентного вклада в светорассеяние частиц той или иной фракции предложенная «семиотическая» классификация ЛК-спектров мочи предполагает идентификацию 8 субфракционных сдвигов. Наименование семиотического сдвига отражает только общий характер идентифицируемого спектра, разбитого на 4 дискретные зоны. Так, катаболически-подобные сдвиги характеризуют кластеры, в которых снижается вклад высокомолекулярных субфракций за счет повышения содержания среднемолекулярных (51–200 нм). Интоксикационно-подобные сдвиги, соответствующие большей степени гидролиза высокомолекулярных субфракций, характеризуются перераспределением в сторону среднемолекулярных и, частично, низкомолекулярных (до 50 нм) субфракций. Дистрофически-подобные сдвиги, соответствующие предельным значениям гидролиза гликопротеиновых ингредиентов, характеризуются высоким контрастированием низкомолекулярной фракции спектра (до 50 нм). Аллерго-подобные сдвиги соответствуют повышенной экскреции с мочой высокомолекулярных субстратов (201–600 нм), а аутоиммуно-подобные — предельному контрастированию наиболее высокомолекулярной зоны спектра (выше 600 нм).

С целью идентификации связи уропротеинов с определенными, регистрируемыми с помощью ЛКС светорассеивающими субфракциями, исследование проводили с нативными образцами мочи и после осаждения в них белковых ингредиентов в присутствии 0,58 М раствора NaCl. Связь осаждаемых уропротеинов с различными размерами биоингредиентов в моче определялась по характеру выявляемых трансформаций в ЛК-спектрах, анализируемых по 4 выделенным дискретным зонам.

Таблица 1

Изменение субфракционного состава мочи после осаждения Тамм–Хорсфалл протеина в общей популяции детей в зависимости от типа семиотического сдвига

№ фракции (размер частиц)	Вклад в светорассеяние		p
	До осаждения, $\bar{X}\pm m$, %	После осаждения, $\bar{X}\pm m$, %	
Катаболически-подобные сдвиги (n=14)			
1 (0–50 нм)	26,7±1,2	24,8±1,7	0,6
2 (51–200 нм)	44,8±2,1	44,3±5,7	0,5
3 (201–600 нм)	22,0±1,9	25,0±6,1	0,58
4 (>600 нм)	6,1±2,3	5,0±2,0	0,96
Дистрофически-подобные сдвиги (n=8)			
1 (0–51 нм)	36,1±1,6	34,6±3,0	0,9
2 (51–201 нм)	46,6±1,2	53,0±3,5	0,2
3 (201–600 нм)	13,9±2,4	9,6±2,1	0,2
4 (>600 нм)	3,1±1,3	2,5±1,6	0,4
Интоксикационно-подобные сдвиги (n=13)			
1 (0–50 нм)	27,2±1,0	29,8±2,6	0,32
2 (51–201 нм)	59,2±0,9	45,7±3,8	0,0009
3 (201–600 нм)	12,6±1,2	13,1±3,0	0,4
4 (>600 нм)	0,7±0,4	11,0±5,5	0,026
Аллерго-подобные сдвиги (n=33)			
1 (0–50 нм)	13,1±1,2	23,9±1,9	0,00005
2 (51–201 нм)	43,8±3,1	48,5±2,6	0,26
3 (201–600 нм)	41,2±3,1	16,4±2,1	0,000001
4 (>600 нм)	1,6±0,6	10,9±3,0	0,08
Аутоиммунно-подобные сдвиги (n=7)			
1 (0–50 нм)	14,6±2,4	30,1±2,8	0,007
2 (51–201 нм)	36,3±7,2	36,0±6,9	0,8
3 (201–600 нм)	10,4±2,7	21,4±7,4	0,44
4 (>600 нм)	38,1±11,3	11,7±7,6	0,034

Как следует из табл. 1, в общей популяции детей осаждение ТХП из той или иной зоны спектра происходило дифференцированно в зависимости от вида семиотического сдвига. Наиболее значимое осаждение наблюдалось в обла-

сти высоко- и сверхвысокомолекулярных фракций при аллерго- и аутоиммунно-подобных сдвигах. Полученные результаты свидетельствуют о том, что природа крупномолекулярных субфракций мочи при данных семиотических сдвигах, регистрируемых методом ЛКС, представлена преимущественно гликопротеином Тамма—Хорсфалла. Так как основными молекулярными формами белка в моче являются агрегаты с молекулярной массой 7 000 000 и 28 000 000 дальтон [3], то осаждение гликопротеина из высоко- или сверхвысокомолекулярной зоны спектра может быть связано с различной степенью полимеризации белка. При интоксикационно-подобных сдвигах ТХП, по-видимому, находится в дезагрегированном состоянии (или мономерной форме) [17], поэтому осаждается из среднемолекулярной фракции. Отсутствие существенных трансформаций субфракционного состава мочи после осаждения белка при дистрофически- и катаболически-подобных сдвигах может быть связано с определенной степенью гидролитической модификации гликопротеинов, в результате чего они не высаливаются в 0,58 М растворе NaCl. Известно, что мелкие фрагменты, составляющие $^1/_2$—$^1/_{32}$ молекулы Тамма—Хорсфалла протеина, не осаждаются слабыми солевыми растворами [3].

В дальнейшем мы сравнили динамику субфракционного состава мочи в зависимости от типа семиотического сдвига до и после осаждения гликопротеина Тамма—Хорсфалла при пиелонефрите, МКБ и кристаллуриях по сравнению с контрольной группой. Оказалось, что независимо от наличия или отсутствия почечной патологии после высаливания белка 0,58 М раствором NaCl наиболее существенное снижение светорассеивания наблюдалось в области крупномолекулярных фракций при аллерго- и аутоиммунно-подобных семиотических сдвигах. Это подтверждает высказанное выше предположение о том, что высокомолекулярные субфракции ЛК-спектра мочи представлены преимущественно гликопротеином Тамма—Хорсфалла различной степени полимеризации.

В связи со склонностью ТХП к агрегации его размер может варьировать в зависимости от изменений физико-химических свойств мочи. Выяснив, из какой фракции ЛК-спектра осаждается гликопротеин при различных семиотических сдвигах, мы сравнили встречаемость отдельных субфракционных сдвигов в нативных образцах мочи в зависимости от ее осмоляльности.

Как следует из табл. 2, в контрольной группе детей нами обнаружены достоверные различия по частоте встречаемости семиотических сдвигов, характеризующихся преобладанием процессов гидролиза гликопротеинов (дистрофически-, интоксикационно-, катаболически-подобные) или их полимеризации (аллерго- и аутоиммунно-подобные) в зависимости от величины осмоляльности (χ^2=10,2; p<0,05).

Таблица 2

Зависимость направления семиотического сдвига ЛК-спектра мочи от величины ее осмоляльности

Направление семиотических сдвигов	Диапазон осмоляльности мочи, ммоль/кг H_2O					
	До 600		600–800		Выше 800	
	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%
Контрольная группа (n=37)						
Полимерно-направленные	1	14	10	64	11	78
Гидролитически-направленные	6	86	6	36	3	22
Всего	7	100	16	100	14	100
Кристаллурии (n=89)						
Полимерно-направленные	20	62	14	54	18	58
Гидролитически-направленные	12	38	12	46	13	42
Всего	32	100	26	100	31	100
Мочекаменная болезнь (n=32)						
Полимерно-направленные	8	61	2	33	3	23
Гидролитически-направленные	5	39	4	66	10	77
Всего	13	100	6	100	13	100
Пиелонефрит (n=17)						
Полимерно-направленные	4	31	1	50	1	50
Гидролитически-направленные	9	69	1	50	1	50
Всего	13	100	2	100	2	100

Так, у здоровых детей по мере нарастания осмоляльности мочи увеличивалась встречаемость полимерно-направленных сдвигов. Учитывая, что при данных сдвигах ТХП осаждался из высокомолекулярной зоны спектра, можно утверждать, что их обнаружение в норме связано с полимеризацией гликопротеина по мере концентрирования мочи. В свою очередь гидролитически-направленные сдвиги у здоровых детей регистрировались при более низких значениях осмоляльности мочи, что отражает либо меньшую степень полимеризации белка, либо его углеводную модифицируемость.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в норме характер субфракционных

сдвигов в моче, определяемых методом ЛКС, зависит не только от ингредиентного состава мочи, но и определяется ее физико-химическими свойствами, что обуславливает различную степень полимеризации основного гликопротеина мочи.

Противоположная картина наблюдалась при МКБ: сдвиги ЛК-спектра, связанные с увеличением вклада в светорассеяние высокомолекулярных частиц, встречались преимущественно при осмоляльности мочи до 600 ммоль/кг H_2O, тогда как выше 600 ммоль/кг H_2O регистрировались только гидролитически-направленные. Сходные изменения отмечались и при пиелонефрите. Отсюда мы можем предположить, что обнаружение аллерго- и аутоиммунно-подобных сдвигов у детей с МКБ и пиелонефритом при более низких значениях осмоляльности мочи может быть связано с изменением структуры самого белка Тамма—Хорсфалла и полимеризацией его при более низкой концентрации мочи, что согласуется с данными литературы [7, 12, 13].

У детей с кристаллуриями аллерго- и аутоиммунно-подобные сдвиги обнаруживались в широком диапазоне осмоляльности, встречаясь с одинаковой частотой как при осмоляльности мочи до 600 ммоль/кг H_2O, так и свыше 800 ммоль/кг H_2O. Это лишний раз подтверждает гетерогенность популяции детей с кристаллурическими диатезами. Возможно, именно те пациенты, у которых полимеризация белка происходит при низкой осмоляльности мочи, и будут составлять группу риска по МКБ.

Результаты проведенного исследования соответствуют данным литературы о том, что ТХП в моче может существовать в различном агрегантном состоянии, что и определяет его «поведение» в норме и при патологии почек.

Известно, что гиперосмоляльность мочи является одним из факторов риска МКБ. Нами выявлена прямая зависимость степени активности процесса камнеобразования, определяемого по системе ЛИТОС, от величины осмоляльности мочи в контрольной группе детей ($r=0,74$; $p<0,00001$) и у пациентов с кристаллурическими диатезами ($r=0,55$; $p<0,00001$). При этом у здоровых детей процесс камнеобразования умеренной и высокой степени активности (II–III) не обнаруживался при осмоляльности мочи ниже 600 ммоль/кг H_2O, а его вероятность резко возрастала при значениях выше 800 ммоль/кг H_2O (табл. 3). В тоже время у части детей с кристаллуриями, МКБ и пиелонефритом процесс камнеобразования регистрировался и при более низких значениях осмоляльности мочи — от 200 до 600 ммоль/кг H_2O. Это свидетельствует о том, что при данных нозологиях осмоляльность не является определяющим фактором камнеобразования.

Таблица 3

Зависимость процесса камнеобразования от величины осмоляльности мочи у детей контрольной группы, пациентов с кристаллуриями, МКБ и пиелонефритом

Степень камнеобрзования	Величина осмоляльности мочи, ммоль/кг H_2O									
	0–400		400–600		600–800		800–1000		>1000	
	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%
Контроль										
0–I	1	100	8	100	18	95	7	46	–	–
II–III	–	–	–	–	1	5	8	53	3	100
Всего	1	100	8	100	19	100	15	100	3	100
Кристаллурии										
0–I	12	100	21	87	22	71	9	39	1	9
II–III	–	–	3	13	9	29	14	61	10	91
Всего	12	100	24	100	31	100	23	100	11	100
Мочекаменная болезнь										
0–I	4	80	8	73	6	100	3	50	3	37,5
II–III	1	20	3	27	–	–	3	50	5	62,5
Всего	5	100	11	100	6	100	6	100	8	100
Пиелонефрит										
0–I	5	100	7	78	3	75	–	–	–	–
II–III	–	–	2	22	1	25	1	100	–	–
Всего	5	100	9	100	4	100	1	100	–	–

Таким образом, нами выявлена связь активного процесса камнеобразования, определяемого с помощью системы ЛИТОС, с величиной осмоляльности мочи у здоровых детей и пациентов с кристаллуриями: вероятность камнеобразования резко возрастала в условиях концентрированной мочи, что диктует необходимость поддержания достаточного питьевого режима для профилактики формирования камней мочевой системы.

В то же время процесс камнеобразования при МКБ и пиелонефрите наблюдался в более широком диапазоне осмоляльности мочи, что предполагает ведущую роль иных механизмов в

процессе литогенеза, которые снижают порог осмоляльности, необходимый для начала кристаллизации. Возможно, у здоровых детей и большинства пациентов с кристаллуриями по мере нарастания осмоляльности мочи происходит изменение структуры гликопротеинов мочи. В тоже время при МКБ и пиелонефрите камнеобразование, возможно, связано с первичными изменениями структуры уропротеинов в результате канальцевой дисфункции.

При исследовании субфракционного состава мочи методом ЛКС и сравнении его с результатами ЛИТОС-теста было обнаружено, что в контрольной группе детей при наличии активного процесса камнеобразования различной степени выраженности (I—III) резко снижалась встречаемость сдвигов ЛК-спектра, связанных с гидролизом гликопротеиновых субстанций (7,4% по сравнению с 52% при отсутствии камнеобразования). В тоже время выявление кристаллизации солей в белковой зоне сопровождалось увеличением встречаемости (60%) субфракционных сдвигов, связанных с умеренной полимеризацией макромолекул мочи (аллергоподобные сдвиги) — (табл. 4).

Таблица 4

Встречаемость отдельных семиотических сдвигов ЛК-спектра мочи в зависимости от наличия или отсутствия процесса камнеобразования по системе ЛИТОС у детей с МКБ и кристаллуриями по сравнению с контрольной группой

Направление семиотического сдвига	Контроль		Кристаллурии		МКБ	
	Процесс камнеобразования					
	нет	есть	нет	есть	нет	есть
Умеренная полимеризация	10 (37%)	6 (60%)	14 (30%)	14 (37%)	4 (25%)	4 (25%)
Выраженная полимеризация	3 (11%)	2 (7%)	14 (30%)	6 (16%)	2 (12,5%)	2 (12,5%)
Умеренный гидролиз	4 (15%)	1(3,7%)	10 (21%)	6 (16%)	8 (50%)	5 (31%)
Выраженный гидролиз	10 (37%)	1 (3,7%)	9 (19%)	12 (31%)	2 (12,5%)	5 (31%)
Всего	27(100%)	10(100%)	47(100%)	38(100%)	16(100%)	16(100%)

Противоположные данные получены при МКБ: активный процесс камнеобразования сопровождался увеличением встречаемости сдвигов ЛК-спектра мочи, связанных с выраженным гидролизом (интоксикационно- и дистрофически-подобные) гликопротеинов мочи (31% по сравнению с 12,5%) и снижением встречаемости сдвигов с умеренным гидролизом. У детей с кристаллуриями процесс камнеобразования, выявляемый зональным методом, с одной стороны, сопровождался незначительным увеличением встречаемости аллерго-подобных сдвигов (как в контрольной группе), а с другой стороны, — увеличением вклада сдвигов ЛК-спектра, связанных с выраженным гидролизом (как при МКБ) и снижением встречаемости сдвигов, связанных с выраженной полимеризацией гликопротеинов (аутоиммунно-подобных).

В активную фазу пиелонефрита при наличии кристаллизации солей в периферической белковой зоне тест-образца регистрировались только гидролитически-направленные сдвиги ЛК-спектра (дистрофически-подобные и катаболически-подобные).

При обследовании детей с кристаллуриями в динамике наиболее часто наблюдались трансформации катаболически-подобных сдвигов в аллерго-подобные и наоборот, которые обнаруживались у 7 из 22 детей (30%), а также — аллерго-подобных сдвигов в аутоиммунно-подобные (26%). У остальных детей наблюдались самые разнообразные сочетания. При этом переходы аллерго-подобных в катаболически-подобные сдвиги и наоборот не имели определенной связи с активностью камнеобразования, определяемой по системе ЛИТОС. Тогда как трансформация аллерго-подобных в аутоиммунно-подобные практически всегда сопровождалась положительной динамикой ЛИТОС-теста.

Таким образом, нами выявлены различные изменения субфракционного состава мочи при наличии активного процесса камнеобразования, выявляемого с помощью системы ЛИТОС: у здоровых детей и части пациентов с кристаллуриями активный процесс камнеобразования сопровождался накоплением в спектре высокомолекулярных, а при МКБ и пиелонефрите — низкомолекулярных субфракций. По-видимому, в этом кроется причина выявленной нами ранее различной сцепленности процесса камнеобразования с величиной осмоляльности мочи у детей изученных групп.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования выявлено, что после осаждения в моче гликопротеина Тамма—Хорсфалла 0,58 М раствором

NaCl независимо от наличия или отсутствия почечной патологии наиболее существенное снижение светорассеивания наблюдается в области высокомолекулярных субфракций (201–600 нм и выше). Отсюда следует, что природа высокомолекулярных субфракций мочи, определяемых методом ЛКС, представлена преимущественно гликопротеином Тамма–Хорсфалла и определяется различной степенью полимеризации его молекул. Осаждение ТХП из среднемолекулярной зоны спектра при интоксикационно-подобных сдвигах, по-видимому, отражает накопление мономеров гликопротеина [17]. А отсутствие трансформации субфракционного состава мочи при дистрофически- и катаболически-подобных сдвигах может быть связано с определенной степенью гидролитической модификации белка, в результате чего он не осаждается слабыми солевыми растворами [3]. Отсюда следует, что характер субфракционных сдвигов в моче зависит от физико-химических свойств макромолекул мочи, что обуславливает различную степень их полимеризации. Этим можно объяснить частые трансформации одних семиотических сдвигов в другие, наблюдаемые нами у одних и тех же пациентов.

С учетом двойственной роли ТХП (промоторной и протекторной) в процессах камнеобразования [10, 15, 24] обнаружение его в высокомолекулярной зоне спектра (201–600 нм) при аллерго-подобных сдвигах свидетельствует о том, что белок находится в агрегированном состоянии и может действовать и как промотор, и как ингибитор кристаллообразования. Еще большая степень полимеризации белка (при аутоиммунно-подобных сдвигах) обуславливает скорее его промоторную роль в кристаллообразовании, так как полимеры являются лучшими нуклеаторами, чем мономеры [9]. Индукция нуклеации может приводить к снижению перенасыщения мочи камнеобразующими солями и является компенсаторным механизмом, что подтверждается увеличением встречаемости аутоиммунно-подобных сдвигов при отсутствии камнеобразования по системе ЛИТОС. Кроме того, трансформация аллерго-подобных сдвигов в аутоиммунно-подобные во всех наблюдениях сопровождалась положительной динамикой ЛИТОС-теста. По-видимому, в физиологических условиях макромолекулы мочи действуют как модуляторы кристаллизации, выступая в роли промоторов нуклеации и ингибиторов роста и агрегации кристаллов [8], а их влияние на процесс камнеобразования во многом зависит от окружающей среды, в том числе от физико-химических свойств мочи [21].

Выявленная нами прямая связь полимерно-направленных сдвигов с величиной осмоляльности мочи и активным процессом камнеобразования у здоровых детей свидетельствует о том, что появление данных семиотических сдвигов в норме связано с полимеризацией гликопротеина по мере концентрирования мочи. В то же время обнаружение данных семиотических сдвигов у больных с МКБ и пиелонефритом при более низких значениях осмоляльности мочи (ниже 600 ммоль/кг H_2O) может быть обусловлено изменением структуры самого ТХП и полимеризацией его при более низкой концентрации мочи, что приводит к изменению функции белка [12, 13].

Повышение осмоляльности мочи у больных с мочекаменной болезнью сопровождалось увеличением встречаемости активного процесса камнеобразования и сдвигов ЛК-спектра, связанных с различной степенью гидролиза гликопротеина, который, будучи в дезагрегированной форме, утрачивает ингибирующую способность. Возможно, феномен патологической кристаллизации камнеобразующих солей в периферической белковой зоне тест-образца мочи (Шатохиной–Шабалина) [6] связан с появлением низкомолекулярных белков, являющихся результатом гидролиза гликопротеиновых субстанций и имеющих тропность к определенным солям. Данное предположение подтверждается выявлением в моче больных с рецидивирующим уролитиазом низкомолекулярных белков, не обнаруживаемых в моче здоровых людей [11, 14]. Не исключено, что именно эти белки и покрывают поверхность мочевых кристаллов [16]. Это объясняет различные механизмы, лежащие в основе данного феномена у здоровых детей, части пациентов с кристаллуриями, больных с МКБ и пиелонефритом. Поэтому выявление кристаллизации солей в белковой зоне, наряду с высокой осмоляльностью мочи и регистрацией субфракционных сдвигов, связанных с накоплением в спектре высокомолекулярных частиц, является прогностически более благоприятным признаком, так как простое увеличение водной нагрузки может изменить ситуацию. В то же время обнаружение активного процесса камнеобразования, наряду со сравнительно низким уровнем осмоляльности мочи и/или регистрацией субфракционных сдвигов, сопровождающихся увеличением вклада в светорассеяние низкомолекулярных субфракций, является прогностически менее благоприятным и свидетельствует о снижении коллоидной стабильности мочи. Возможно, это может служить критерием риска развития МКБ у детей с кристаллуриями, а также неблагоприятного течения уролитиаза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Одновременное определение субфракционного состава, осмоляльности мочи и кристаллизации солей в периферической белковой зоне тест-образца мочи позволяет дифференцировать механизмы камнеобразования на основе изменений физико-химических свойств основных уропротеинов.

2. Субфракционные сдвиги в области низкомолекулярных форм белков мочи предполагают наиболее неблагоприятный прогноз относительно течения нефропатий, что, скорее всего, связано с активацией гидролиза и некробиотических процессов в интерстиции почек.

3. Высокополимерные формы гликопротеинов (аллерго-подобные сдвиги ЛК-спектра) обеспечивают коллоидную стабильность мочи. Их дальнейшая полимеризация (аутоиммунно-подобные сдвиги) приводит к индукции процессов нуклеации кристаллов, что является компенсаторным механизмом, снижающим перенасыщение мочи камнеобразующими солями.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Лопаткин Н.А., Яненко Э.К. Мочекаменная болезнь // Русск. мед. журн.—2000.—Т. 8, № 3.—С. 117–120.

2. Молекулярно-генетические и биофизические методы исследования в медицине / Под ред. Ю.И.Бажора, В.И.Кресюн, В.Н.Запорожан.—Киев: Здоровье, 1996.—205 с.

3. Пушкарев И.А. Лабораторная диагностика протеинурий.—Рига: Зинатне, 1985.—119 с.

4. Сазонец О.И., Бируля И.В., Хоровская Л.А. и др. Исследование различных биологических жидкостей методом лазерной корреляционной спектроскопии у больных бронхиальной астмой // Клин. лаб. диагностика.—1997.—№ 5.—С. 84.

5. Хлебникова Н.Н., Таринец В.Л., Карганов М.Ю. и др. Перспективы применения метода лазерной корреляционной спектроскопии слезной жидкости в диагностике тяжести патологического процесса при консервативных и оперативных методах лечения глазных болезней // Лазерная медицина.—1999.—№ 3–4.—С. 25–31.

6. Шатохина С.Н., Шабалин В.Н. Ранняя диагностика уролитиаза, определение степени его активности и состава камнеобразующих солей мочи (система ЛИТОС) // Урол. и нефрол.—1998.—№ 3.—С. 19–23.

7. Boeve E.R., Cao L.C., de Bruijn W.C. et al. Zeta potential distribution on calcium oxalate crystal and Tamm-Horsfall protein surface analyzed with doppler electrophoretic light scattering // J. Urology.—1994.—Vol. 152.—P. 531–536.

8. Cambell A.A., Ebrahimpour A., Perez L. et al. The dual role of polyelectrolytes and proteins as mineralizations promoters and inhibitors of calcium oxalate monohydrate // Calcif. Tissue Int.—1989.—Vol. 45.—P. 122–128.

9. Cerini C., Geider S., Dussol B. et al. Nucleation of calcium oxalate crystals by albumin: Involvement in prevention of stone formation // Kidney Int.—1999.—Vol. 55.—P. 1776–1786.

10. Grover P.K., Ryall R.L., Marshall V.R. Does Tamm-Horsfall mucoprotein inhibit or promote calcium oxalate crystallization in human urine? // Clin. Chim. Acta.—1990.—Vol. 190.—P. 223.

11. Grover P.K., Resnick M.I. Evidence for the presence of abnormal proteins in the urine of recurrent stone formers // J. Urology.—1995.—Vol. 153.—P. 1716–1721.

12. Hess B., Nakagawa Y., Parks J.H., Coe F.L. Molecular abnormality of Tamm-Horsfall glycoprotein in calcium oxalate nephrolithiasis // Am. J. Physiol.—1991.—Vol. 260.—P. F569–F578.

13. Jefferson A., Reynolds T.M., Elves A., Wirzbicki A.S. Patients with recurrent renal stones have a physico-chemically altered urinary Tamm-Horsfall glycoprotein profile // Ann. Clin. Biochem.—1996.—Vol. 33.—P. 540–544.

14. Jones W.T., Resnick M.I. The characterization of soluble matrix proteins in selected human renal calculi using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis // J. Urology.—1990.—Vol. 144.—P. 1010–1014.

15. 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.—Vol. 40.—P. 1739–1743.

16. Leal J.J., Finlayson B. Adsorption of naturally occurring polymers onto calcium oxalate crystal surfaces // Invest. Urol.—1977.—Vol. 14.—P. 278–283.

17. Oliver C.J., Pike E.R., Cleave A.J., Peacocke A.R. Determination of the diffusion coefficient and molecular weight of Tamm-Horsfall glycoprotein by intensity fluctuation spectroscopy // Biopolymers.—1971.—Vol. 10.—P. 1731–1733.

18. Orskov I., Ferencz A., Orskov F. Tamm-Horsfall protein or uromucoid is the normal urinary slime that traps type 1 fimbriated E. coli // Lancet.—1980.—Vol. 1.—P. 887.

19. Patel R., Mc Kenzie J.K., Mc Quenn E.G. Tamm-Horsfall urinary mucoprotein and tubular obstruction by casts in acute renal failure // Lancet.—1964.—Vol. 1.—P. 457–461.

20. Queen E.G. The nature of urinary casts // J. Clin. Pathol.—1962.—Vol. 15.—P. 367–373.

21. Queen E.G., Engel G.B. Factors determining the aggregation of urinary mucoprotein // J. Clin. Pathol.—1966.—Vol. 19.—P. 392–396.

22. Reinhart H.H., Obedeanu N., Sobel J.D. Quantitation of Tamm-Horsfall protein binding to uropathogenic Escherichia coli and lectins // J. Inf. Dis.—1990.—Vol. 162.—P. 1335–1340.

23. Ryall R.L. Glycosaminoglycans, proteins, and stone formation: adult themes and child's play // Pediatr. Nephrol.—1996.—Vol. 10.—P. 656–666.

24. Scure D.S., Robertson W.G. Modifiers of calcium oxalate crystallization found in urine. III. Studies on the role of Tamm-Horsfall mucoprotein and of ionic strength // J. Urology.—1986.—Vol. 136.—P. 505–507.

Поступила в редакцию 20.09.2000 г.