

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ Экспериментальные исследования

ORIGINAL ARTICLES Experimental investigations

© Н.А. Верлов, В.С. Бурдаков, Л.А. Иванова, И.А. Кулаков, А.А. Богданов, В.Л. Эмануэль, 2024
УДК [616.61/.63-092 : 616.6 : 579.22]-092.4

doi: 10.36485/1561-6274-2024-28-2-85-93

EDN: PRGIJT

РОЛЬ МИКРОБИОТЫ МОЧЕВОГО ТРАКТА И ПРОТЕОМА МОЧИ В ПАТОГЕНЕЗЕ УРОЛИТИАЗА

*Николай Александрович Верлов^{1,✉}, Владимир Станиславович Бурдаков²,
Любовь Алексеевна Иванова³, Игнатий Анатольевич Кулаков⁴,
Алексей Александрович Богданов⁵, Владимир Леонидович Эмануэль⁶*

^{1,2,3,4} Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Гатчина, Россия;

⁵ Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический) имени Н.П. Напалкова, Санкт-Петербург, Россия;

⁶ кафедра клинической лабораторной диагностики, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

¹ verlov_na@pnpi.nrcki.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3756-0701>

² burdakov_vs@pnpi.nrcki.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6025-7367>

³ ivanova_la@pnpi.nrcki.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3341-4344>

⁴ kulakov_ia@pnpi.nrcki.ru, <https://orcid.org/0009-0003-5952-4773>

⁵ bogdanov_aa@zdrav.spb.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7887-4635>

⁶ Emanuel V.L., <https://orcid.org/0000-0002-2079-0439>

РЕФЕРАТ

Патогенетический подход к метафилактике уролитиаза повсеместно является социально-значимой проблемой здравоохранения ввиду роста заболеваемости и особенно его рецидивирующего течения, несмотря на достижения фармакотерапии и применение литотрипсии. Патологический кристаллогенез рассматривается как следствие превышения порога растворимости ряда минеральных компонентов мочи, с одной стороны, и как следствие посттрансляционных дефектов основного протеома мочеобразования – уромодулина (UMOD), демонстрирующего у здоровых саногенетическую систему обеспечения стабильности биофизического гомеостаза: коллоидных свойств мочи. Однако, кроме этого, UMOD, связывая маннозо-зависимые пили инфекционных агентов, блокирует контакт бактерий с уротелиоцитами, притом что инфицирование мочевого тракта является известным фактором уролитиаза. Путем моделирования мочи у здоровых лиц соинкубацией с бактериями *E. coli* продемонстрировано снижение концентрации полимеризованного уромодулина в моче, как фактор увеличения риска образования кристаллов оксалата кальция.

Ключевые слова: уролитиаз, биокристалломикс, протеом, уромодулин, биофизический гомеостаз, коллоидные свойства мочи, *E. coli*, оксалат кальция

Для цитирования: Верлов Н.А., Бурдаков В.С., Иванова Л.А., Кулаков И.А., Богданов А.А., Эмануэль В.Л. Роль микробиоты мочевого тракта и протеома мочи в патогенезе уролитиаза. *Нефрология* 2024;28 (2):85-93. doi: 10.36485/1561-6274-2024-28-2-85-93. EDN: PRGIJT

ROLE OF URINARY TRACT MICROBIOTA AND URINE PROTEOME IN UROLITHIASIS PATHOGENESIS

*Nikolay A. Verlov^{1,✉}, Vladimir S. Burdakov², Lyubov A. Ivanova³, Ignatyi A. Kulakov⁴,
Aleksey A. Bogdanov⁵, Vladimir L. Emanuel⁶*

^{1,2,3,4} Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC «Kurchatov Institute», Gatchina, Russia;

⁵ Napalkov State Budgetary Healthcare Institution «Saint-Petersburg clinical scientific and practical center for specialised types of medical care (oncological)», Saint-Petersburg, Russia;

⁶ Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia

¹ verlov_na@pnpi.nrcki.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3756-0701>

² burdakov_vs@pnpi.nrcki.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6025-7367>

³ ivanova_la@pnpi.nrcki.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3341-4344>

⁴ kulakov_ia@pnpi.nrcki.ru, <https://orcid.org/0009-0003-5952-4773>

⁵ bogdanov_aa@zdrav.spb.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7887-4635>

⁶ Emanuel V.L., <https://orcid.org/0000-0002-2079-0439>

ABSTRACT

The pathogenetic approach to the metaphylaxis of urolithiasis is universally a socially significant health problem due to the increase in morbidity and, especially, its recurrent course, despite the achievements of pharmacotherapy and the use of lithotripsy. Pathological crystallogenesis is considered as a consequence of exceeding the solubility threshold of a number of mineral components of urine, on the one hand, and as a consequence of posttranslational defects of the main proteome of urination - uromodulin (UMOD), demonstrating in healthy people a sanogenetic system for ensuring the stability of biophysical homeostasis: colloidal properties of urine. However, in addition, UMOD, by binding mannose-dependent pills of infectious agents, blocks the contact of bacteria with urotheliocytes, despite the fact that infection of the urinary tract is a known factor of urolithiasis. By modeling the urine of healthy individuals by coinubation with *E. coli* bacteria, a decrease in the concentration of polymerized uromodulin in urine was demonstrated as a factor in increasing the risk of formation of calcium oxalate crystals.

Keywords: urolithiasis, biocrystallomics, proteome, uromodulin, biophysical homeostasis, urine colloidal properties, *E. coli*, calcium oxalate

For citation: Verlov N.A., Burdakov V.S., Ivanova L.A., I.A. Kulakov I.A., Bogdanov A.A., Emanuel V.L. Role of urinary tract microbiota and urine proteome in urolithiasis pathogenesis. *Nephrology (Saint-Petersburg)* 2024;28(2):85-93. (In Russ.) doi: 10.36485/1561-6274-2024-28-2-85-93. EDN: PRGIJT

ВВЕДЕНИЕ

Уролителиаз является важной клинической проблемой как у взрослых, так и у детей. У каждого десятого человека в течение жизни происходит манифестация мочекаменной болезни [1], однако, механизмы, ответственные за образование мочевых камней, остаются в значительной степени неизученными. Принято считать, что необходимым и достаточным условием образования камней в моче является перенасыщение, процесс, при котором концентрация веществ в моче, таких как кальций и оксалаты, превышает пределы их растворимости [2]. Вместе с тем, нельзя не отметить, что химический состав мочи у лиц с уролителиазом и без него значительно пересекается [3]. Кроме того, при перенасыщении мочи оксалатом кальция в тесте на чувствительность к оксалату показана склонность к образованию камней у пациентов с рецидивирующим уролителиазом в сравнении со здоровыми добровольцами, при схожем химическом составе мочи [4]. Несмотря на то, что перенасыщенная моча сама по себе является фактором риска, одного этого условия недостаточно для формирования камней, так увеличение потребления жидкости и цитратных солей для снижения перенасыщения мочи оксалат кальция (CaOx) лишь умеренно снижает частоту рецидивов [5].

Магниево-аммонийфосфатные (струвитные) камни (скопление бактерий, кристаллов и белковой матрицы) образуются в результате инфекции мочевыводящих путей бактериями, продуцирующими уреазу [6]. При этом струвиты составляют лишь 4% мочевых камней, тогда как (CaOx) обнаруживается более чем в 60% случаев [7]. Бактерии способствуют образованию струвитных камней в моче, при этом роль бактерий в развитии более распространенных камней из CaOx и фосфата кальция менее изучена. Ряд наблюдений указывают на возможную связь между мочевыми

камнями и бактериями. Так, например, отмечается высокая частота инфекций мочевыводящих путей у пациентов с уролителиазом и многочисленные случаи положительных посевов конкрементов камней, в том числе состоящих из CaOx [8, 9]. Первоначальное изучение механизмов, лежащих в основе этой связи, указывает на то, что бактерии избирательно агрегируют в кристаллы, и их присутствие связано с усиленным слипанием кристаллов, стимулирующим встраивание белков в матрицу камней.

Цель работы. В настоящем исследовании мы выдвигаем концепцию относительно роли бактериальной инфекции мочевыводящих путей (на примере *E.coli*) в патогенезе оксалатного уролителиаза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на образцах мочи, полученных от здоровых добровольцев ($n = 33$). Для анализа брали утреннюю мочу в объеме 50 мл, взятие проводили в стерильную ёмкость без использования консервантов и заморозки, время хранения до анализа составляло не более 3 ч. Образец нативной мочи от каждого из добровольцев разделяли на две части. Первую часть – нативную мочу – анализировали без предварительных манипуляций. Ко второй части добавляли 10^{10} клеток *E.coli* на 10 мл образца мочи и проводили соинкубацию в течение 5 мин при интенсивном перемешивании, после чего центрифугировали (2000 об/мин, 10 мин) и отбирали супернатант. Осадок, содержащий бактерии и белковую компоненту мочи, отбирали для анализа методом электрофореза. Супернатант фильтровали через мембрану с размером пор 0,22 мкм для удаления бактериальной компоненты и передавали для дальнейшего анализа.

При инкубации образца мочи в присутствии

E.coli использовали штамм DH5α («ThermoFisher Scientific», Массачусетс, США). Культуру клеток поддерживали на среде LB (пептон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л и NaCl 10 г/л), содержащей 1 % агара. Для использования в эксперименте культура наращивалась в жидкой среде LB в течение ночи при температуре 37 °C и встряхивании со скоростью 110 об/мин. Перед соинкубацией клетки подвергали двукратной отмывке от среды посредством центрифугирования (центрифуга «ELMI», 2000 об./мин, 10 мин) и замены супернатанта на 0,9 % р-р хлорида натрия.

Определение массовой концентрации катионов и анионов в моче и сыворотке крови проводили методом капиллярного электрофореза («КАПЕЛЬ-105М», «Люмэкс», Россия). Образцы анализа центрифугировали в течение 5 мин при 1800xg, после чего отбирали супернатант и разбавляли его в 250 раз. В образцах сыворотки мочи проводили измерение массовой концентрации катионов аммония, калия, натрия и кальция.

Концентрацию общего белка в образцах мочи определяли колориметрическим методом по Бредфорду («Bradford protein assay», «BioRad», США) [10]. В одноразовых оптических кюветах смешивали 900 мкл раствора Бредфорда и 100 мкл исследуемого образца, перемешивали 5 мин, после чего проводили измерение поглощения на длине волны 595 нм («NanoPhotometer Implen P330», «Implen», Германия). Концентрацию белка рассчитывали с помощью калибровочной кривой, построенной для известных концентраций человеческого сывороточного альбумина.

Концентрацию альбумина в моче определяли с использованием набора реагентов «Альбумин-Вет» («Вектор БЕСТ», Россия). К 500 мкл раствора бромкрезолового зеленого добавляли 20 мкл образца, полученную смесь перемешивали в течение 5 мин и проводили измерение интенсивности окраски комплекса на длине волны 628 нм («NanoPhotometer Implen P330», «Implen», Германия).

Концентрацию кальция определяли колориметрическим методом с использованием набора реагентов «Кальций-Ново» («Вектор БЕСТ», Россия). В пробирке типа «Эппендорф» смешивали 500 мкл реагента, содержащего арсеназо III, и 5 мкл исследуемого образца, перемешивали и через 5 мин, проводили измерение величины оптической плотности на длине волны 630 нм. Концентрацию кальция рассчитывали с использованием калибровочной кривой для различных разведений входящего в набор раствора калибратора.

Концентрацию уромодулина в образцах измеряли иммуноферментным методом с исполь-

зованием набора «Human Uromodulin ELISA kit» («BioVendor», Чехия). Для анализа использовали процедуру с применением буфера «TEA» (сокращение: «Triton, EDTA, Alkaline»). Для приготовления буфера «TEA» использовали 0.5 % Triton X-100 и 20 mM EDTA, полученную смесь титровали 40 % NaOH до pH 7,5 [11]. Образец мочи разбавляли в 2000 раз буфером «TEA» и наносили на 96-луночный планшет набора, инкубировали 1 ч, вносили антиглобулиновый конъюгат и субстрат, сигнал детектировали на планшетном сканере («EnSpire Multilabel Plate Reader», «PerkinElmer», США) в режиме измерения оптической плотности при длине волны 550 нм. Концентрацию уромодулина из величины поглощения рассчитывали с помощью калибровочной кривой, построенной для входящего в набор калибровочного образца.

Для визуализации и сравнения вклада различных белковых компонент мочи, отличающихся молекулярной массой, была проведена процедура гель-электрофореза в денатурирующих условиях. Сначала образцы мочи подвергли процедуре диализа против воды в мешках с размером пор, соответствующим пропусканию молекул с массой 14 КДа для очистки образца от солей и мочевины. Затем образцы концентрировали с использованием вакуумного концентратора («Eppendorf Concentator plus complete system», «Eppendorf», Германия) в 10 раз. Одномерный электрофорез препаратов проводили в присутствии SDS с концентрацией полиакриламида 10 % в разделяющем геле и 5 % в концентрирующем геле. Анализируемые образцы помещали в стандартный буфер для нанесения (0,065 М Трис, pH 6,8, 2 % SDS, 1 % ДТТ, 10 % глицерина, 0,01 % бромфенолового синего) и прогревали на кипящей водяной бане в течение 2 мин, после чего наносили 10 мкл образца на дорожку. Разделение проводили в камере для вертикального гель-электрофореза («MidiPage», «Cleaver Scientific», Великобритания) при постоянной мощности 3 Вт на гель с использованием блока питания («PowerPacHC», «BioRad», США). Окрашивание геля проводили коллоидным серебром [12] и фотографировали с помощью системы для гель-документирования («Biorad GelDoc», «Biorad», США).

Тест на стабильность коллоида мочи являлся аналогом Боннского индекса оценки риска («Bonn Risk Index», BRI) [13, 14]. К образцу мочи добавляли 3,3 % раствор NH₄Ox так, чтобы итоговая концентрация оксалата составила 1 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,25 мг/мл и 0,125 мг/мл. После добавления оксалата аммония проводили сканирование в оптическом планшете в планшетном сканере

(«EnSpire Multilabel Plate Reader», «PerkinElmer», США) в течение 40 мин (измерение раз в 30 с). Также полуколичественный аналог теста проводили с использованием микроскопии на системе визуализации «EVOS FL Auto», анализ проводился при добавлении к 300 мкл образца мочи в лунку 96-луночного планшета раствора NH_4Ox до конечной концентрации 0,5 мг/мл, после чего 1 раз в 30 сек в течение 40 мин фотографировали осадок на дне лунки планшета с образцом.

Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения «R language» в среде «RStudio». Для оценки пропорциональной изменчивости выборки использовали коэффициент корреляции Пирсона (r -Пирсона). Для сравнения выборок использовали ранговый суммарный тест Вилкоксона, критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался как p менее 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные измерения pH, плотности, концентрации катионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и NH_4^+ для образцов нативной мочи и образцов мочи после соинкубации с *E.coli* представлены в таблице 1. Показано, что соинкубация в присутствии *E.coli* не оказывает влияния на оцениваемые параметры.

Данные измерения pH, плотности мочи, концентрации катионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} образцов мочи (методом капиллярного электрофореза)

Measurement data of pH, urine density, concentration of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} cations of urine samples (by capillary electrophoresis)

Показатель	Нативная моча n = 13 (95% CI)	Соинкубация <i>E.coli</i> n = 13 (95% CI)	p-value
Плотность, г/см ³	1,016 (1,014, 1,017)	1,019 (1,016, 1,021)	0,093
pH, ед.	7,10 (6,43, 7,11)	6,89 (6,45, 7,20)	0,7
Проводимость, мкСм	9,65 (7,34, 12,17)	9,53 (7,30, 12,43)	>0,9
Концентрация Na^+ , мг/мл	5,534 (5,057, 5,727)	5,505 (5,063, 5,896)	0,9
Концентрация K^+ , мг/мл	2,441 (2,435, 2,456)	2,484 (2,431, 2,540)	0,4
Концентрация Ca^{2+} , мг/мл	110 (94, 112)	96 (86, 97)	0,027
Концентрация NH_4^+ , мг/мл	0,61 (0,47, 0,76)	0,61 (0,50, 0,72)	0,6

Таблица 1 / Table 1

Данные биохимического анализа, измерения концентрации общего белка (по Бредфорду) и концентрации уромодулина

Data from biochemical analysis, measurements of total protein concentration (according to Bradford) and uromodulin concentration

Показатель	Нативная моча n = 13 (95% CI)	Соинкубация <i>E.coli</i> n = 13 (95% CI)	p-value
Альбумин, мкг/мл	43 (35, 49)	43 (38, 53)	0,6
Концентрация Ca^{2+} , ммоль/мл	1,95 (1,76, 1,98)	1,79 (1,66, 1,80)	0,022
Общий белок, мкг/мл	99 (83, 107)	64 (50, 80)	<0,001
Уромодулин, мкг/мл	55 (46, 57)	26 (15, 32)	<0,001

Таблица 2 / Table 2

Измерение концентрации кальция проводили также биохимическим методом, полученные данные показали хорошую сходимость с данными, полученными методом капиллярного электрофореза (таблица 2).

Концентрация общего белка (по Бредфорду) после соинкубации с бактериями снижалась почти на 40 % относительно исходных образцов (см. таблицу 2). Наблюдаемая динамика концентрации общего белка на фоне отсутствия достоверных изменений в концентрации альбумина хорошо соотносится с динамикой концентрации уромодулина. Как указывали ранее, уромодулин обладает высоким сродством к пилиям 1-го типа *E.coli*, что приводит к тому, что он частично осаждается с бактериями. При анализе осадка после центрифугирования можно отметить, что осадок в образце с мочой существенно превосходит по объему осадок, полученный от такого же количества бактерий при их центрифугировании в физиологическом растворе (рисунок 1). Уменьшение концентрации уромодулина и, как следствие, общего белка после соинкубации с бактериями носит достоверный характер ($p < 0,001$).

Данные электрофоретического разделения белка в образцах нативной мочи, супернатанта и осадка после соинкубации с бактериями, приведены на рисунке 2. В нативной моче (см. рисунок 2, дорожки 2,9) хорошо заметны две полосы в области 67 и 105 кДа, соответствующие альбумину и мономеру уромодулина [15]. В моче после соинкубации с бактериями полоса 105 кДа не детектируется или детектируется слабо (см. рисунок 2, дорожки 3,8). В геле осадка (см. рисунок 2, дорожки 4,7) после соинкубации и центрифугирования полоса 67 кДа, соответствующая альбумину, практически не детектируется, при этом полоса 105 кДа, соответствующая уромодулину, хорошо детектируется. В геле осадка также хорошо детектируются белки, соответствующие образцу *E.coli* (см. рисунок 2, дорожки 5,6).

Для проведения теста на стабильность коллоида (аналога «Bonn Risk Index», BRI) образцы нативной мочи и мочи после соинкубации раскапывали по 200 мкл в лунки 96-луночного

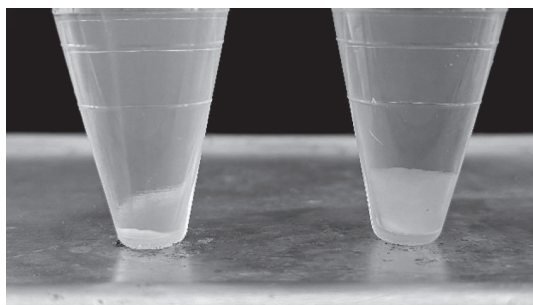


Рисунок 1. Осадок бактерий *E. coli* (10^{10} клеток) после осаждения при центрифугировании в 0,9% р-р хлорида натрия (слева) и образце мочи (соинкубация в течение 5 мин с *E. coli*, справа).

Figure 1. Sediment of *E. coli* bacteria (10^{10} cells) after precipitation during centrifugation in saline solution (left) and in a urine sample (incubation for 5 minutes with *E. coli*, right).

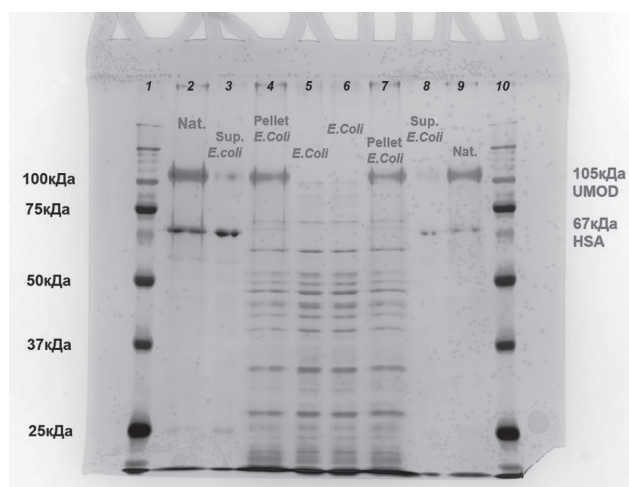


Рисунок 2. Электрофорез белков мочи. 1, 10 – маркер молекулярной массы; 2, 9 – образец нативной мочи; 3, 8 – супернатант после соинкубации с *E. coli*; 4, 7 – гель - осадок после соинкубации с *E. coli*; 5, 6 – бактерии *E. coli*.

Figure 2. Electrophoresis of urine proteins. 1, 10 is a marker of molecular weight; 2, 9 is a sample of native urine; 3, 8 is a supernatant after incubation with *E. coli*; 4, 7 is a gel precipitate after incubation with *E. coli*; 5, 6 is *E. coli* bacteria.

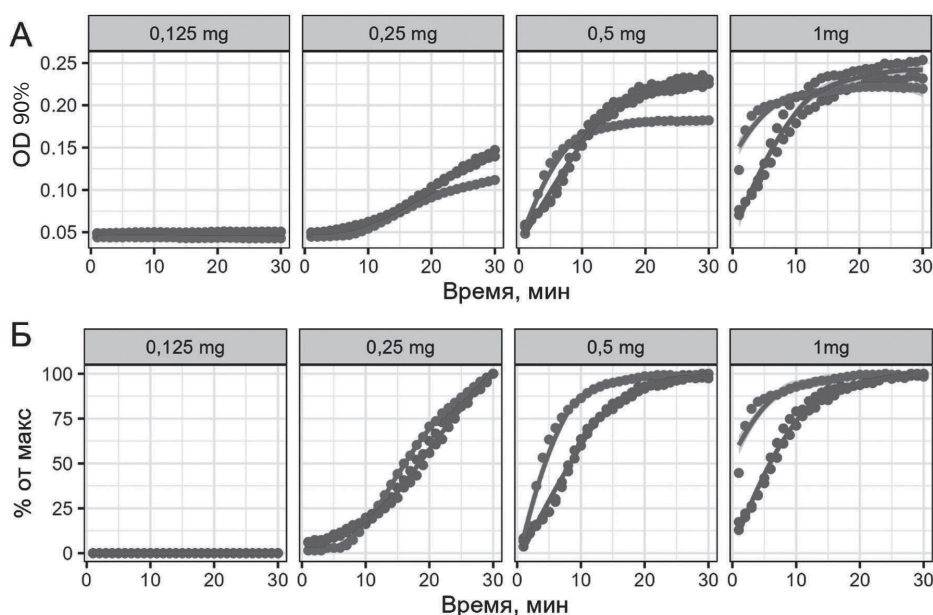


Рисунок 3. Динамика изменения оптической плотности образца нативной мочи (зеленый) и мочи после соинкубации с *E. coli*. А – в единицах оптической плотности; Б – в процентах от максимальной величины оптической плотности ($100\% \cdot OD_n / OD_{max}$).
Figure 3. Dynamics of changes in the optical density of a sample of native urine (green) and urine after incubation with *E. coli*. A is in units of optical density. B – as a percentage of the maximum optical density ($100\% \cdot OD_n / OD_{max}$).

планшета и титровали оксалатом аммония до конечной концентрации 0,125 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл и 1 мг/мл. После чего проводили измерение на планшетном ридере с частотой кадров 3 кадра в 1 мин. Типичные кривые, отражающие динамику изменения поглощения в течение времени приведены на рисунке 3. Изменение поглощения связано с образованием нерастворимого осадка оксалата кальция. Можно отметить, что при концентрации NH_4Ox 0,125 мг/мл не наблюдалось изменения оптической плотности (OD) относительно исходной величины. При концентрации NH_4Ox 0,25 мг/мл после 10 мин наблюдается увеличение OD образца, однако, за 40 мин, в течение которых проводили измерение, кривая роста не успела выйти на плато. В случае, когда концентрация оксалата аммония составляла 0,5 или 1 мг/мл отмечалась динамика роста с выходом на плато относительно постоянных значений величины OD. Наиболее информативной была кривая, соответствующая концентрации 0,5 мг/мл, так как при интервале наблюдения 45 мин удавалось зафиксировать начало роста и последующий её выход на плато насыщения.

Количественная характеристика полученных данных кривых изменения OD в образцах до и после соинкубации с *E. coli* проводилась по схеме, представленной на рисунке 4. По оси ординат проводили линию, соответствующую $OD_{90\%} = 0,9OD_{max}$. От пересечения линии $OD_{90\%}$ с кривой изменения OD во времени опускали проекцию на ось абсцисс и определяли время. На рисунке 4 для концентрации оксалата аммония 1 мг/мл время насыщения (соответствующее $OD_{90\%}$) образца нативной мочи составляло 15,5 мин, тогда как для образца мочи после соинкубации с *E. coli* $t=7,5$ мин. Для кон-

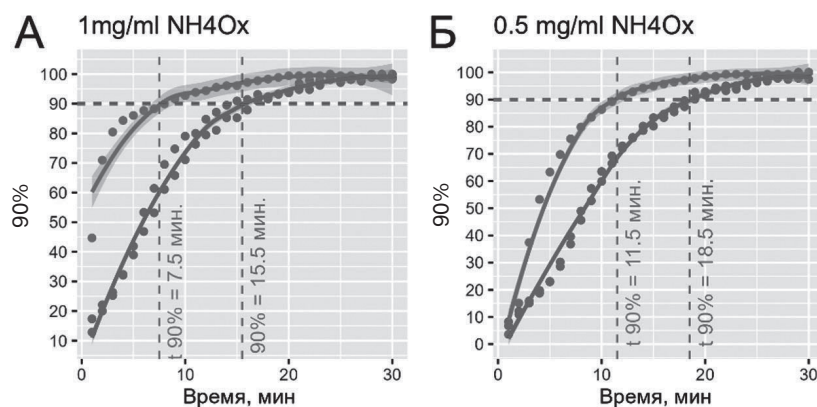


Рисунок 4. Анализ кривых изменения OD на фоне добавления NH_4Ox в концентрации 1 мг/мл (А) и 0,5 мг/мл (Б).
Figure 4. Analysis of OD curves against the background of NH_4Ox addition at concentrations of 1 mg/ml (A) and 0.5 mg/ml (B).

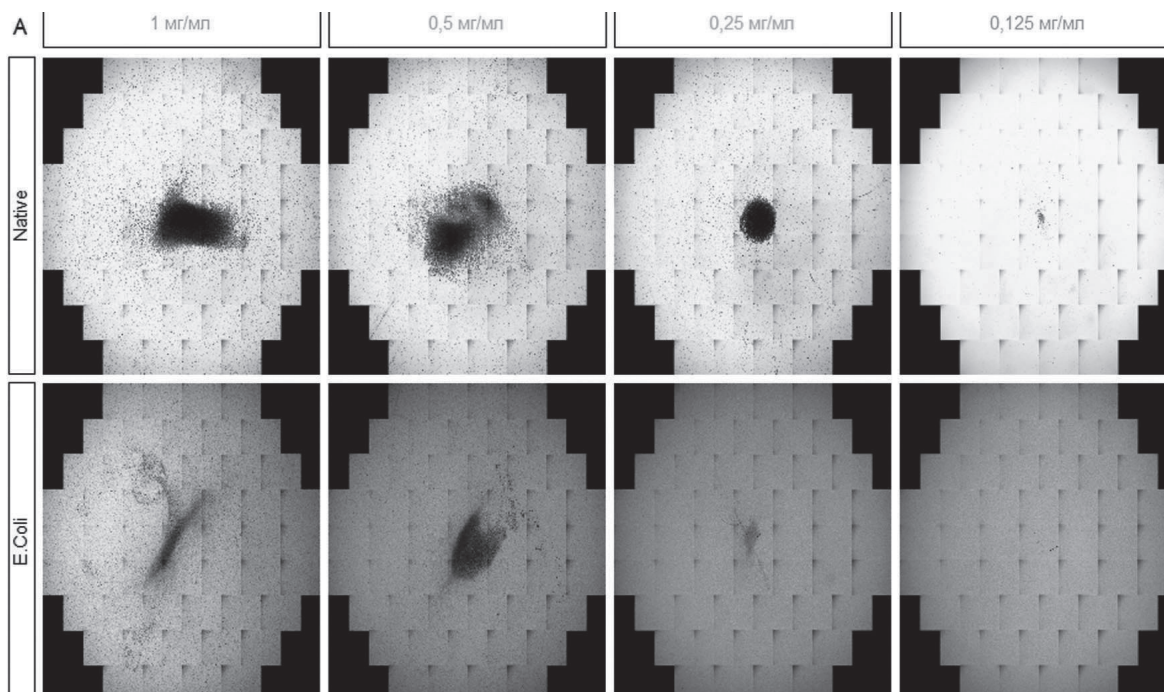


Рисунок 5. Микроскопия осадка образца нативной мочи (Native) и образца мочи после соинкубации с *E. coli* при добавлении различных объемов оксалата аммония (до конечной концентрации 1 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,25 мг/мл и 0,125 мг/мл).
Figure 5. Microscopy of the sediment of a native urine sample and a urine sample after coincubation with *E. coli* with the addition of various volumes of ammonium oxalate (up to a final concentration of 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml and 0.125 mg/ml).

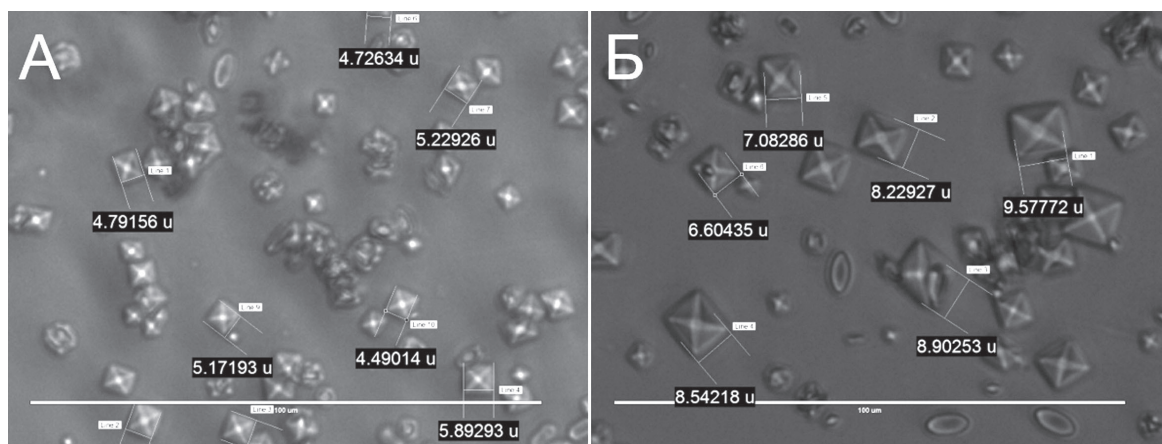


Рисунок 6. Микроскопия осадка образца нативной мочи и образца мочи, после соинкубации с *E. coli*, после добавления NH_4Ox до конечной концентрации 0,5 мг/мл (через 1 ч после добавления).
Figure 6. Microscopy of the sediment of a native urine sample and a urine sample, after incubation with *E. coli*, after addition of NH_4Ox to a final concentration of 0.5 mg/ml (1 hour after addition).

Таблица 3 / Table 3

Время, соответствующее OD90% для образцов нативной мочи и образцов мочи, после соинкубации с *E. coli*
The time corresponding to OD 90% for native urine samples and urine samples after incubation with *E. coli*

	Нативная моча N = 13 (95% CI)	Соинкубация <i>E. coli</i> N = 13 (95% CI)	p-value
NH ₄ Ox 1 мг/мл	12.30 (10.20, 12.60)	4.50 (3.90, 4.90)	<0.001
NH ₄ Ox 0,5 мг/мл	17.6 (16.2, 19.4)	8.4 (7.9, 9.8)	<0.001

центрации оксалата аммония 0,5 мг/мл время составляло 18,5 и 11,5 мин для образца нативной и соинкубированной мочи соответственно.

Обобщённые данные для исследованных образцов представлены в таблице 3. Во всех случаях можно отметить, что время насыщения OD_{90%} меньше для образцов мочи после соинкубации с *E. coli*, также для кривых роста OD характерен больший наклон. Уменьшение времени достижения OD_{90%} после соинкубации с *E. coli* носит достоверный характер при концентрации NH₄Ox 1 и 0,5 мг/мл. Уменьшение времени говорит о том, что система стабилизации коллоида мочи обладает меньшей способностью к ингибированию кристаллогенеза и более склонная к образования нерастворимого осадка оксалата кальция в аналогичных условиях индукции кристаллогенеза. Так как бактериальная составляющая удалена из образца мочи, мы связываем уменьшение стабильности коллоида с уменьшением концентрации уромодулина в образце.

Данные микроскопии осадка представлены на рисунке 5. Можно отметить, что количество осадка пропорционально количеству оксалата аммония, добавленному к каждому из образцов, что хорошо соотносится с количеством кальция в образцах от 1,5 ммоль/л и больше. Также совокупное количество осадка и, с некоторой поправкой, OD образца в лунке планшета сопоставимы для одинаковых концентраций оксалата аммония в образцах нативной и соинкубированной мочи. Отличие между образцом мочи, соинкубированным с бактериями, и образцом нативной мочи состоит, на наш взгляд, в том, что осадок образца нативной мочи локализован, преимущественно, по центру лунки, тогда как осадок мочи, соинкубированной с *E. coli*, более равномерно распределен по дну лунки, что свидетельствует о большей подвижности и меньшей адгезии осадка в первом случае. При промывке лунки водой можно отметить, что осадок в образце нативной мочи практически не остается на дне лунки, что также говорит о его низкой адгезии к ее поверхности. Осадок образца

мочи, соинкубированного с бактериями, напротив, не удаляется при промывке, для его удаления с поверхности дна лунки планшета требуется механическое воздействие.

Помимо того, что осадок образца, соинкубированного с бактериями, обладает большей адгезией к дну лунки планшета, микроскопический анализ осадка

(рисунок 6) указывает на то, что размер образовавшихся кристаллов оксалата кальция почти в 2 раза превосходит размер кристаллов, обнаруженных в осадке нативной мочи при добавлении идентичного количества оксалата аммония [линейный размер в нативном образце – 5,2 (4,1, 6,8), в образце после соинкубации – 8,4 (6,2, 9,2), мкм, Median (IQR)].

ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение стабильности коллоида мочи после соинкубации с бактериями в течение непродолжительного времени служит убедительным доказательством связи уропатогенных микроорганизмов с процессом камнеобразования в моче. Как уже обсуждали во введении, проблема кристаллогенеза в моче касается парадоксальных, с точки зрения биоминерализации в бактериальных системах, условий. Так образование кристаллов оксалата кальция происходит в диапазоне pH от 4 до 5,5 с участием уреазанегативных бактерий, не демонстрирующих склонности к образованию нерастворимого минерального осадка в системах *in vitro*. Вместе с тем, эпидемиологические данные, касающиеся мочекаменной болезни, указывают на связь с наличием именно этой группы бактерий, среди которых наиболее часто встречается *E. coli*. До настоящего времени механизмы увеличения риска образования нерастворимых конкрементов в моче остаются неизученными. Выявленная в нашей работе связь между изменением концентрации полимеризованного уромодулина в моче на фоне соинкубации с бактериями *E. coli* и увеличением риска образования кристаллов оксалата кальция при проведении теста на стабильность коллоида носит фундаментальный характер. Полученные данные хорошо соотносятся с исследованиями, посвященными структуре полимеров уромодулина и его взаимодействию с бактериальными пиллями. Уменьшение концентрации уромодулина приводит к снижению стабильности коллоида и образованию кристаллов, прежде всего, за счет уменьшения времени, необходимого

для их образования. Также в образцах мочи, соинкубированных с *E.coli*, отмечена тенденция увеличения размера кристаллов почти в 2 раза, при этом осадок характеризуется повышенной адгезией к поверхности дна лунки планшета. Осадок нормальной мочи более подвижен, в нем обильно представлена белковая компонента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, патогенез уролитиаза, ассоциированного с уропатогенными бактериями, имеет однозначную связь с изменением концентрации свободного полимеризованного уромодулина в моче.

Мы считаем, что стабильность мочи следует рассматривать не только как способность коллоида полностью ингибировать процесс образования первичных микрокристаллов, но и как увеличение длительности процесса образования нерастворимого осадка – достаточно крупных конкрементов, неспособных к естественной экскреции с током мочи из-за их размеров или адгезии с поверхностью эпителия, выстилающего мочеточники или мочевого пузыря. Наличие уромодулина в контексте ионного состава мочи, концентрации ионов натрия, калия и кальция и потенциальных индукторов кристаллогенеза, например, оксалатов, определяет стабильность коллоида и его способность противостоять образованию невыводимых конкрементов в интервалах времени между естественным удалением мочи из организма.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ REFERENCES

1. Pak CY. Kidney stones. *Lancet* 1998;351(9118):1797–1801. doi:10.1016/S0140-6736(98)01295-1
2. Coe FL, Parks JH, Asplin JR. The pathogenesis and treatment of kidney stones. *N Engl J Med* 1992;327(16):1141–1152. doi:10.1056/NEJM199210153271607
3. Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. Twenty-four-hour urine chemistries and the risk of kidney stones among women and men. *Kidney Int* 2001;59(6):2290–2298. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00746.x
4. Borghi L, Guerra A, Meschi T et al. Relationship between supersaturation and calcium oxalate crystallization in normals and idiopathic calcium oxalate stone formers. *Kidney Int* 1999;55(3):1041–1050. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.0550031041.x
5. Borghi L, Meschi T, Amato F, Briganti A, Novarini A, Giannini A. Urinary volume, water and recurrences in idiopathic calcium nephrolithiasis: a 5-year randomized prospective study. *J Urol* 1996;155(3):839–843
6. Flannigan R, Choy WH, Chew B, Lange D. Renal struvite stones-pathogenesis, microbiology, and management strategies. *Nat Rev Urol* 2014;11(6):333–341. doi:10.1038/nrur.2014.99
7. Pak CY, Poindexter JR, Adams-Huet B, Pearle MS. Predictive value of kidney stone composition in the detection of metabolic abnormalities. *Am J Med* 2003;115(1):26–32. doi:10.1016/s0002-9343(03)00201-8
8. Thompson RB, Stamey TA. Bacteriology of infected stones. *Urology* 1973;2(6):627–633. doi:10.1016/0090-4295(73)90323-3
9. Tavichakorntrakool R, Prasongwattana V, Sungkeeree S, et al. Extensive characterizations of bacteria isolated from catheterized urine and stone matrices in patients with nephrolithiasis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc – Eur Ren Assoc* 2012;27(11):4125–4130. doi:10.1093/ndt/gfs057
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999
11. Kobayashi K, Fukuoka S. Conditions for solubilization of Tamm-Horsfall protein/uromodulin in human urine and establishment of a sensitive and accurate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. *Arch Biochem Biophys* 2001;388(1):113–120. doi:10.1006/abbi.2000.2265
12. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc* 2006;1(4):1852–1858. doi:10.1038/nprot.2006.288
13. Porowski T, Zoch-Zwierz W, Wasilewska A, Spotyk A, Konstantynowicz J. Normative data on the Bonn Risk Index for calcium oxalate crystallization in healthy children. *Pediatr Nephrol Berl Ger* 2007;22(4):514–520. doi:10.1007/s00467-006-0383-0
14. Laube N, Schneider A, Hesse A. A new approach to calculate the risk of calcium oxalate crystallization from unprepared native urine. *Urol Res* 2000;28(4):274–280. doi:10.1007/s002400000124
15. Schaeffer C, Santambrogio S, Perucca S, Casari G, Rampoldi L. Analysis of uromodulin polymerization provides new insights into the mechanisms regulating ZP domain-mediated protein assembly. *Mol Biol Cell* 2009;20(2):589–599. doi:10.1091/mbc.e08-08-0876

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания по теме: «Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально-значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения.» (регистрационный номер №121060200125-2).

Financial support: supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Project No. № 121060200127-6).

Сведения об авторах:

Верлов Николай Александрович, канд. биол. наук
188300, Россия, г. Гатчина, Ленинградская обл., мкр. Орлова Роша д. 1, НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, заведующий Ресурсным центром ОМРБ. Тел.: +7(813-71)4-60-93; verlov_na@pnpi.nrcki.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3756-0701>

Бурдаков Владимир Станиславович
188300, Россия, г. Гатчина, Ленинградская обл., мкр. Орлова Роша д. 1, НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, младший научный сотрудник. Тел.: +7(813-71)4-60-93; E-mail: burdakov_vs@pnpi.nrcki.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6025-7367>

Иванова Любовь Алексеевна,
188300, Россия, г. Гатчина, Ленинградская обл., мкр. Орлова Роша д. 1, НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, младший научный сотрудник. Тел.: +7(813-71)4-60-93; E-mail: ivanova_la@pnpi.nrcki.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3341-4344>

Кулаков Игнатий Анатольевич
188300, Россия, г. Гатчина, Ленинградская обл., мкр. Орлова Роша д. 1, НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, старший лаборант. Тел.: +7(813-71)4-60-93; E-mail: kulakov_ia@pnpi.nrcki.ru. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-5952-4773>

Богданов Алексей Александрович
197758, Санкт-Петербург, ул. Ленинградская, д. 68а. ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический) имени Н.П. Напалкова». E-mail: bogdanov_aa@zdrav.spb.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7887-4635>

Проф. Эмануэль Владимир Леонидович, д-р мед. наук
197022, Санкт-Петербург. ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, кафедра клинической лабораторной диагностики. Тел.: (812) 338 6611; E-mail: vladimirem1@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2079-0439>

About the authors:

Nikolay A. Verlov, Ph.D.

Affiliations: 188300, Russia, Leningradskaya oblast, Gatchina 1, mkr. Orlova roshcha, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P.Konstantinov of NRC «Kurchatov Institute», Head of Resource Center of the Molecular and Radiation Biophysics Division. Phone: +7(813-71)4-60-93; E-mail: verlov_na@pnpi.nrcki.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3756-0701>

Vladimir S. Burdakov

Affiliations: 188300, Russia, Leningradskaya oblast, Gatchina 1, mkr. Orlova roshcha, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P.Konstantinov of NRC «Kurchatov Institute», staff scientist of the Molecular and Radiation Biophysics Division. Phone: +7(813-71)4-60-93; E-mail: burdakov_vs@pnpi.nrcki.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6025-7367>

Lyubov A. Ivanova

Affiliations: 188300, Russia, Leningradskaya oblast, Gatchina 1, mkr. Orlova roshcha, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P.Konstantinov of NRC «Kurchatov Institute», staff scientist of the Molecular and Radiation Biophysics Division. Phone: +7(813-71)4-60-93; E-mail: ivanova_la@pnpi.nrcki.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3341-4344>

Ignatiy A. Kulakov

Affiliations: 188300, Russia, Leningradskaya oblast, Gatchina 1, mkr. Orlova roshcha, Petersburg Nuclear Physics Institute named

by B.P.Konstantinov of NRC «Kurchatov Institute», laboratory assistant of the Molecular and Radiation Biophysics Division. Phone: +7(813-71)4-60-93; E-mail: kulakov_ia@pnpi.nrcki.ru. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-5952-4773>

Aleksey A. Bogdanov

Affiliations: 197758, Russia, Saint-Petersburg, Napalkov State Budgetary Healthcare Institution «Saint-Petersburg clinical scientific and practical center for specialised types of medical care (oncological)», Phone.: ; E-mail: bogdanov_aa@zdrav.spb.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7887-4635>

Prof. Vladimir L. Emanuel, MD, PhD, DMedSci

Affiliations: 197022, Russia, Saint-Petersburg, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, head. Phone: (812) 338 6611; E-mail: vladimirem1@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2079-0439>

Вклад авторов. Верлов Н.А. – идея, сбор материала и обработка, написание статьи; Бурдаков В.С. – сбор материала, проведение измерений; Иванова Л.А. – сбор материала, работа с бактериями; Кулаков И.А. – сбор материала, проведение измерений; Богданов А.А. – написание статьи; Эмануэль В.Л. – научное редактирование статьи.

Contribution of the authors. Verlov N.A. – idea, collection of material, processing of material, writing the article; Burdakov V.S. – collection of material, making measurements; Ivanova L.A. – material collection, work with bacteria; Kulakov I.A. – collection of material, making measurements; Bogdanov A.A. – article writing; Emanuel V.L. – scientific editing of the text.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflict of interest.

Статья поступила в редакцию 26.04.2024;
одобрена после рецензирования 26.05.2024;
принята к публикации 27.05.2024
The article was submitted 26.04.2024;
approved after reviewing 26.05.2024;
accepted for publication 27.05.2024