

УДК [616.8-009.86-056.7:577.132.3-022.252]:575.17-07

DOI: 10.14427/jipai.2023.1.43

Диагностическая значимость определения количества копий гена *SERPING1* у пациентов с разными типами наследственного ангиоотёка, связанного с дефицитом ингибитора C1-эстеразы

И.Е. Гурьянова, Е.А. Полякова, А.В. Любушкин, Л.Б. Коростелева, В.И. Казак, Ю.С. Жаранкова, Д.В. Луцкович, М.В. Белевцев

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск

Diagnostic value of copy number identification of the *SERPING1* gene in patients with different types of hereditary angioedema associated with C1-esterase inhibitor deficiency

I.E. Guryanova, E.A. Polyakova, A.V. Liubushkin, L.B. Korosteleva, V.I. Kazak, Yu.S. Zharankova, D.V. Lutskovich, M.V. Belevtsev

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk

Аннотация

Введение. Наследственный ангиоотёк (НАО) представляет собой редкое, генетически опосредованное, сложно диагностируемое и угрожающее жизни заболевание, с ожидаемой частотой встречаемости около 1:10 000 – 1:50 000, без расовых и половых различий. Актуальность клинической проблемы обусловлена сложностями диагностики и лечения пациентов с НАО, а также серьёзным и всесторонним влиянием заболевания на жизнь пациентов.

Цель. Дать оценку диагностической значимости определения количества копий гена *SERPING1* у пациентов с разными типами наследственного ангиоотёка, связанного с дефицитом ингибитора C1-эстеразы.

Материалы и методы. В исследование включены образцы биологического материала контрольной группы (n=50) и пациентов с аллельными вариантами в гене *SERPING1* и установленным диагнозом НАО (n=17). Количество копий гена *SERPING1* определяли методом ПЦР «в режиме реального времени». В качестве калибраторов использовали собственные плазмидные стандарты, полученные путём клонирования интересующих последовательностей генов в вектор pTZ57_R Vector. Количество копий гена *SERPING1* на 1 млн мононуклеарных клеток вычисляли по формуле: $[10^6 \times \text{среднее (SQ) копий гена } SERPING1 / \text{среднее (SQ) копий гена } CD64]$.

Результаты. В группе пациентов с НАО тип I диагностическая чувствительность методики определения количества копий гена *SERPING1* составила 83,3%, диагностическая специфичность – 94%, диагностическая эффективность – 90,4%, предсказательная ценность положительного результата – 100%, предсказательная

Summary

Introduction. Hereditary angioedema (HAE) is a rare, genetically mediated, difficult to diagnose, and life-threatening disease, with an expected incidence of about 1 in 10 000 to 1 in 50 000 people with no racial or gender differences. The significance of the issue is proven by the difficulties in diagnosis and treatment of patients with HAE, as well as the profound impact of the disease on patients' lives.

Aim. To assess the diagnostic value of copy number identification of the *SERPING1* gene in patients with different types of hereditary angioedema associated with C1-esterase inhibitor deficiency.

Materials and methods. The study included samples of cDNA from the control group (n=50) and HAE patients with allelic variants in the *SERPING1* gene (n=17). The number of copies of the *SERPING1* gene was determined by real-time PCR. Own plasmid standards obtained by cloning gene sequences of interest into the pTZ57_R Vector were used as calibrators. The number of copies of the *SERPING1* gene per 1 million cells was calculated by the formula: $[10^6 \times \text{average number of copies of the } SERPING1 \text{ gene} / \text{average number of copies of the } CD64 \text{ gene}]$.

Results. In the group of patients with HAE type I, the diagnostic sensitivity of determining the number of copies of the *SERPING1* gene was 83.3%, the diagnostic specificity was 94%, the diagnostic efficiency was 90.4%, the predictive validity of a positive result was 100%, the predictive validity of a negative result was 94.5%. In the group of patients with HAE type II, the diagnostic sensitivity was 40%, the diagnostic specificity was 78%, the diagnostic efficiency was 90%. The obtained data on the determination of copy number identification of the

ценность отрицательного результата – 94,5%. В группе пациентов с НАО тип II диагностическая чувствительность указанной методики составила 40%, диагностическая специфичность – 78%, диагностическая эффективность – 90%. Полученные данные по определению количества копий гена *SERPING1* в диагностике пациентов с НАО, связанным с дефицитом ингибитора С1-эстеразы, в сравнении с измерением количества ингибитора С1-эстеразы в сыворотке крови демонстрируют приемлемые результаты для использования в лабораторной практике.

Ключевые слова

Наследственный ангиоотёк, С1-ингибитор, *SERPING1*, плазмидные стандарты, ПЦР «в режиме реального времени».

Ангиоотёк (АО) – это результат локального повышения проницаемости подслизистых и подкожных капилляров и венул, клинически характеризуется локализованным внезапно возникающим транзиторным и часто рецидивирующим отёком кожи и слизистых оболочек [1]. Помимо наиболее известных провоспалительных медиаторов активации тучных клеток (гистамин; серотонин; фактор, активирующий тромбоциты; цитокины и др.), которые могут являться причиной АО у 20% населения [2], существует вазоактивный медиатор брадикинин, который является основным фактором временного увеличения сосудистой проницаемости у пациентов с редкой формой АО – наследственным ангиоотёком (НАО) [3].

НАО – редкое и потенциально жизнеугрожающее генетическое заболевание, клинически проявляющееся рецидивирующими острыми приступами отёков с поражением любых участков тела, в том числе слизистых оболочек. Отёки, как правило, формируются достаточно медленно – в течение 2-12 часов, затем саморазрешаются в течение 2-5 суток [4]. Причиной НАО являются патологические аллельные варианты, в подавляющем большинстве случаев локализованные в гене с низкой пенетрантностью – *SERPING1*, кодирующем белок ингибитора С1-эстеразы, которые приводят к количественному (НАО тип I) или функциональному (НАО тип II) дефициту этого белка [5, 6]. Ингибитор С1-эстеразы – сериновая протеаза, которая принимает участие в регуляции работы системы комплемента, калликреин-кининовой системы, системы свертывания крови по внутреннему пути и фибринолитической системы [7]. Характерными особенностями отёков при НАО являются отсутствие зуда, гиперемии кожи, сопутствующей крапивницы,

SERPING1 gene in patients with different types of hereditary angioedema associated with C1-esterase inhibitor deficiency in comparison to the measurement of antigenic C1-esterase inhibitor in the blood serum demonstrate feasible results for use in laboratory practice.

Keywords

Hereditary angioedema, C1-inhibitor, *SERPING1*, plasmid standards, real-time PCR.

а также отсутствием терапевтического ответа на применение антигистаминных и кортикостероидных препаратов [8]. Распространенность НАО, связанного с дефицитом ингибитора С1-эстеразы в странах с высоким уровнем оказания диагностической и медицинской помощи составляет 1:10 000 – 1:50 000 [9]. При лабораторной диагностике НАО используются такие основные иммунологические показатели, как определение количества компонентов системы комплемента С4 и ингибитора С1-эстеразы, определение функциональной активности ингибитора С1-эстеразы [8]. Что касается теста по определению количества ингибитора С1-эстеразы при диагностике пациентов с НАО, то у пациентов с НАО тип I его количество в сыворотке, как правило, определяется сниженным более чем на 50% от нижнего значения нормы, а у пациентов с НАО тип II, напротив, детектируется в пределах нормальных значений или завышенным [10]. Ввиду того, что ген *SERPING1* имеет низкую пенетрантность, у носителя патогенетического нарушения первый приступ НАО может развиваться без каких-либо клинических предпосылок. Среди европейской популяции медиана дебюта НАО, связанного с дефицитом ингибитора С1-эстеразы приходится на 8-12 летний возраст, однако описаны случаи дебюта как в 1 год, так и после 40-60 лет [11, 12, 13]. В свою очередь отсутствие или позднее применение эффективной терапии приступа НАО может привести к смерти пациента по причине обструкции верхних дыхательных путей [14]. Таким образом, вопросы ранней диагностики НАО имеют большое клиническое значение и представляют собой актуальную практическую задачу системы здравоохранения. Несмотря на то, что тест по определению количества ингибитора С1-эстеразы в диагностике НАО применяет-

ся с 1990-х годов [15], в Беларуси использование указанного теста ограничено, что затрудняет диагностику. Для решения диагностических и классификационных задач при постановке диагноза НАО в Беларуси мы исследовали диагностическую значимость определения количества копий гена *SERPING1* у пациентов с разными типами НАО, связанного с дефицитом ингибитора С1-эстеразы.

Целью данного исследования явилось дать оценку диагностической значимости определения количества копий гена *SERPING1* у пациентов с разными типами наследственного ангиоотёка, связанного с дефицитом ингибитора С1-эстеразы.

Материалы и методы

Объектом исследования послужили образцы биологического материала условно здоровых индивидов (контрольная группа, $n=50$) из отделения трансфузиологии и экстракорпоральных методов лечения государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», которые по результатам медицинского осмотра были допущены к донорской функции. Чтобы минимизировать риски включения в контрольную группу бессимптомных носителей патогенетического нарушения в гене *SERPING1*, в неё вошли индивиды старше 22 лет. Медиана возраста контрольной группы составила 34,4 года (диапазон: 22-62 года). Помимо этого, в исследование включены образцы биологического материала пациентов ($n=17$) с генетически подтверждённым НАО (5 пациентов с НАО тип II и 12 пациентов с НАО тип I). Всем пациентам с НАО лечение и профилактика приступов заболевания не проводилась на протяжении как минимум двух недель. Информированное согласие получено у всех субъектов и/или их официальных опекунов.

В качестве материала для исследования копий гена *SERPING1* использовали РНК, выделенную из мононуклеарных клеток периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции с показателями оптической плотности 260/280 нм и 230/260 нм $\geq 1,8$. Оптическую плотность нуклеиновых кислот образцов РНК измеряли посредством спектрофотометра DS-11 FX (DeNovix, США). Синтез кДНК осуществляли из 1 μg РНК. Для нормализации экспрессии использовали контрольный ген (*CD64*).

При выполнении полимеразной цепной реакции использовали следующие праймеры и флуоресцентные пробы (Прайм-тех, Беларусь): прямой праймер *SERPING1*

(5'-GTGCCCATGATGAATAGCAAG-3'), обратный праймер *SERPING1* (5'-GCTGGTCGTCACCTTTGATGC-3'), флуоресцентная проба *SERPING1* (5'-FAM-TGTGGCCCATTTTCATTGACCAAACCTTTG-TAMRA-3'); прямой праймер *CD64* (5'-CGACCCCCAGCTACAGAATC-3'), обратный праймер *CD64* (5'-TTCCACGCATGACACCTCAA-3'), флуоресцентная проба *CD64* (5'-HEX-TCCACAGAGGCTGGCTACTACTGCA-TAMRA-3'). Последовательности праймеров с флуоресцентной пробой для генов *SERPING1* и *CD64* заимствованы из статьи [16].

Количество копий гена *SERPING1* подсчитывали методом ПЦР «в режиме реального времени» на программируемом термоциклере CFX96 (Bio-Rad, США). В качестве калибраторов использовали серийные разведения плазмидной ДНК с концентрацией 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 копий в 5 мкл. Плазмидные стандарты представляли собой клонированные в вектор pTZ57_R (Invitrogen, США) последовательности кодирующих областей генов *SERPING1* и *CD64* с наименьшим числом нуклеотидных вариаций. Количество копий гена *SERPING1* на 1 млн. лейкоцитов мононуклеарных клеток рассчитывали по формуле:

$$1000000 \times \frac{\text{среднее кол-во копий гена } SERPING1}{\text{среднее кол-во копий гена } CD64}$$

Реакционная смесь для ПЦР «в режиме реального времени» состояла из 5 мкл воды, 10 мкл 2-кратного буфера с ДНК-полимеразой ArtMix (АртБиоТех, Беларусь) и сток-раствора праймеров (по 6 пмоль прямого и обратного праймеров и 4 пмоль флуоресцентной пробы). Результаты ПЦР «в режиме реального времени» анализировали при помощи математического программного средства Real-Time RCR Data Analysis (Bio-Rad, США).

Количество ингибитора С1-эстеразы подсчитывали в сыворотке крови на специализированном компактном анализаторе Dade Behring BN ProSpec (Siemens, Германия) нефелометрическим методом с использованием набора N Antiserum to Human C1-Inhibitor (Siemens, Германия).

Построение графиков и вычисления выполняли с помощью программы «GraphPad Prism 6.0». Непараметрический критерий Манна-Уитни использовали при определении значимости статистических различий. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы (25%–75%). При построении прогностических моделей исполь-

зовали признаки с уровнем значимости $p < 0,05$. Интегральную диагностическую информативность устанавливали путём построения графика качества бинарной классификации (ROC-анализ) с определением площади под кривой AUC (от англ. Area Under Curve), при интерпретации полученных результатов использовали общепринятую экспертную шкалу. Согласно экспертной шкале, показатель AUC должен находиться в диапазоне от 0,5 до 1, а о высокой диагностической значимости результатов свидетельствует показатель близкий к 1. Кроме этого, о диагностической значимости полученных показателей судили на основании расчёта чувствительности, специфичности, диагностической эффективности, положительной и отрицательной предсказательной ценности.

Результаты и их обсуждения

Для оценки диагностической значимости теста по определению количества копий гена *SERPING1* у пациентов с разными типами НАО, связанного с дефицитом ингибитора С1-эстеразы мы сравнивали данные в контрольной группе и в группе симптомных пациентов с генетически подтвержденным НАО, полученные при определении количества ингибитора С1-эстеразы и количественных показателей гена *SERPING1*.

В контрольной группе медиана количества ингибитора С1-эстеразы в сыворотке крови составила 0,278 (0,241; 0,308) г/л, медиана количества копий гена *SERPING1* составила 708830 (559830; 1076100) копий. В группе пациентов с НАО тип I медиана количества ингибитора С1-эстеразы в сыворотке крови составила 0,054 (0,052; 0,068) г/л, что значительно ниже в сравнении с результатами теста в контрольной группе

($U=1,00$; $p < 0,0001$). Медиана количества копий гена *SERPING1* в группе пациентов с НАО тип I составила 264032 (205754; 392769) копий, что также значительно ниже в сравнении с результатами теста в контрольной группе ($U=13,00$; $p < 0,0001$). В группе пациентов с НАО тип II медиана количества ингибитора С1-эстеразы в сыворотке крови составила 0,324 (0,308; 0,388) г/л, что значительно выше в сравнении с результатами теста в контрольной группе ($U=43$; $p < 0,05$). По количеству копий гена *SERPING1* в группе пациентов с НАО тип II значимых различий в сравнении с результатами теста в контрольной группе не выявлено, медиана составила 739222 (549180; 757991) ($U=94$; $p=0,45$).

При оценке диагностической значимости разработанной нами методики в каждой группе пациентов (среди группы пациентов с НАО тип I и среди группы пациентов с НАО тип II) проводили ROC-анализ с построением кривой (рис. 1). Вычисленная площадь под графиком качества бинарной классификации в группе пациентов с НАО тип I составила $0,978 \pm 0,015$ ($p < 0,0001$), что указывает на «очень хорошее» качество разработанной методики в соответствии с экспертной шкалой AUC, с диагностической чувствительностью и специфичностью равной 83,3% и 94% соответственно. Диагностическая эффективность составила – 90,5%, предсказательная ценность положительного результата – 100%, предсказательная ценность отрицательного результата – 94,5%.

Площадь под ROC-кривой при использовании разработанной нами методики для диагностики пациентов НАО тип II составила $0,60 \pm 1,00$ ($p=0,446$) с диагностической чувствительностью – 40%, специфичностью 78% и диагностической эффективностью 90% (рис. 2).

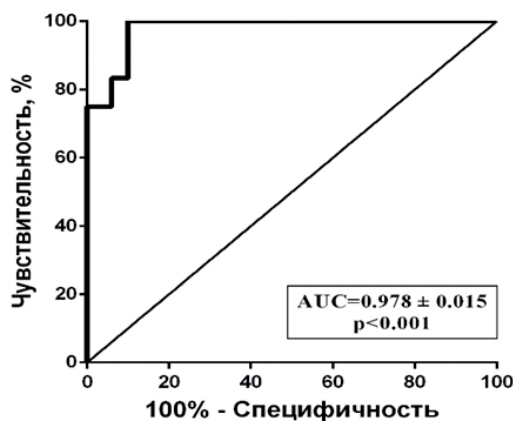


Рис. 1. ROC-кривая определения диагностической значимости подсчёта количества копий гена *SERPING1* в диагностике НАО тип I

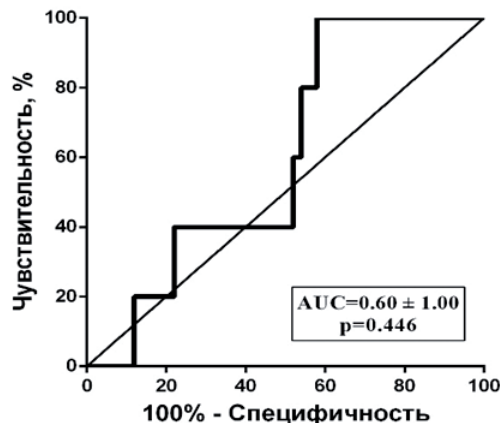


Рис. 2. ROC-кривая определения диагностической значимости подсчёта количества копий гена *SERPING1* в диагностике НАО тип II

Полученные данные относительно возможности использования разработанной нами методики по определению количества копий гена *SERPING1* в диагностике пациентов с НАО, связанным с дефицитом ингибитора С1-эстеразы в сравнении с измерением количества ингибитора С1-эстеразы в сыворотке крови демонстрируют приемлемые результаты для использования в лабораторной практике. Диагностическая информативность определения количества копий гена *SERPING1* в диагностике НАО тип I с высокой чувствительностью и специфичностью позволяет выявить у пациента сниженное количество копий гена *SERPING1* относительно диапазона нормальных значений так же, как и определение количества ингибитора С1-эстеразы в сыворотке крови, который у пациентов с НАО тип I, как правило, снижен.

По результатам проведенного ROC-анализа в группе пациентов с НАО тип II установлено, что значения диагностической чувствительности и специфичности были статистически не значимы, что свидетельствует о невысокой ценности определения копий гена *SERPING1* у пациентов с функциональным дефицитом ингибитора С1-эстеразы. Это обусловлено тем, что у данной группы пациентов, как и количество копий гена *SERPING1*, количество ингибитора С1-эстеразы в сыворотке крови детектируется в диапазоне нормальных значений либо завышенным. Завышение показателей наблюдается тогда, когда после воздействия соответствующих факторов произошла активация синтеза ингибитора С1-эстеразы, однако затем нефункционирующий ингибитор С1-эстеразы не расходуется и таким образом может накапливаться в крови. Диагностическую эффективность, предсказательную ценность положительного и отрицательного результата не рассчитывали ввиду нецелесообразности применения метода в данной группе пациентов.

Заключение

1. Медиана количества копий гена *SERPING1* в группе пациентов с НАО тип I значимо ниже в сравнении с результатами теста в контрольной группе ($U=13,00$; $p<0,0001$), а в группе пациентов с НАО тип II значимых различий с результатами теста в контрольной группе не выявлено ($U=94$; $p=0,45$). Полученные результаты демонстрируют высокую корреляционную взаимосвязь при сопоставлении результатов, полученных при определении количества ингибитора С1-эстеразы в сыворотке крови нефелометрическим методом ($r=0,844$; $p<0,001$).
2. Вычисленная площадь под графиком качества бинарной классификации в группе пациентов с НАО тип I составила $0,987\pm 0,015$ ($p<0,0001$), что указывает на «очень хорошее» качество разработанной методики в соответствии с экспертной шкалой AUC. Полученные результаты свидетельствуют о высокой ценности определения копий гена *SERPING1* у пациентов с количественным дефицитом ингибитора С1-эстераз.
3. Площадь под ROC-кривой для группы пациентов с НАО тип II составила $0,60\pm 1,00$ ($p=0,446$), кроме этого, значения диагностической чувствительности и специфичности были статистически незначимы, что свидетельствует о невысокой ценности определения копий гена *SERPING1* у пациентов с функциональным дефицитом ингибитора С1-эстеразы.
4. Количественный анализ копий гена *SERPING1* в клетках периферической крови может стать новым перспективным инструментом в диагностике НАО, доступным к выполнению во многих учреждениях здравоохранения Беларуси.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке ГП «Научные технологии и техника» на 2021-2025 годы, (подпрограмма 5 «Химические продукты и молекулярные технологии»), № госрегистрации 20213494.

Литература

1. Борисова Т.В., Сокуренок С.И. Ангиоотеки: классификация, диагностика, подходы к терапии. Клиническая практика. 2014; 3: 71–79.
2. Bernstein J.A. et al. The diagnosis and management of acute and chronic urticaria: 2014 update. J Allergy Clin Immunol. 2014; 133(5): 1270–1277.
3. Marceau A. et al. Bradykinin receptors: Agonists, antagonists, expression, signaling, and adaptation to sustained stimulation. International Immunopharmacology. 2020; 82: 106305.
4. Cicardi M. et al. Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary

Angioedema International Working Group. Allergy. 2014; 69(5): 602–616.

5. Maas, C., López-Lera A. Hereditary angioedema: insights into inflammation and allergy. Mol. Immunol. 2019; 112: 378–386.
6. Cicardi M., Zuraw B. L. Angioedema due to bradykinin dysregulation. The J. of Allergy and Clin. Immunol. In Pract. 2018; 6(4): 1132–1141.
7. Davis A., Lu F., Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. Thromb. Haemost. 2010; 104(11): 886–893.

8. Maurer M. et al. The international WAO/EAACI guideline for the management of hereditary angioedema – The 2021 revision and update. *Allergy*. 2022; 77(7):1961–1990.
9. Jindal AK, Bishnoi A, Dogra S. Hereditary Angioedema: Diagnostic Algorithm and Current Treatment Concepts. *Indian Dermatol Online J*. 2021; 12(6): 796–804.
10. Agostoni A. Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *The J. of Allergy and Clin. Immunol*. 2004; 114(3): S51–S131.
11. Longhurst H, Cicardi M. Hereditary angio-oedema. *Lancet*. 2012; 379: 474–481.
12. Guryanova I.E. et al. Demographic characteristics of patients with genetically confirmed hereditary angioedema in the Republic of Belarus. *Immunopathology, allergology, infectology*. 2022; 2:12–18 (in Russian).
13. Zanichelli A. et al. Improvement in diagnostic delays over time in patients with hereditary angioedema: findings from the Icatibant Outcome Survey Clin. and Transl. *Allergy*. 2018; 8: 42.
14. Bork K, Hardt J, Witzke G. Fatal laryngeal attacks and mortality in hereditary angioedema due to C1-INH deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 130(3): 692–697.
15. Porebski G, Kwitniewski M, Reshef A. Biomarkers in Hereditary Angioedema. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021; 60(3): 404–415.
16. Pappalardo E, Zingale LC, Cicardi M. C1 inhibitor gene expression in patients with hereditary angioedema: quantitative evaluation by means of real-time RT-PCR. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 114(3): 638–644.

Сведения об авторах

Гурьянова И.Е. – к.б.н., заведующий лабораторией молекулярно-генетических исследований ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». Адрес: 223053, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43. E-mail: guryanovairina1985@gmail.com.

Полякова Е.А. – к.б.н., заведующий лабораторией генетических биотехнологий. ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». E-mail: polyakovakat86@gmail.com.

Любушкин А.В. – младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований. ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». E-mail: sasha36601@yandex.by.

Коростелева Л.Б. – к.б.н., врач клинической лабораторной диагностики группы биохимии и фармакологии. ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии».

Казак В.И. – младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований. ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». E-mail: vk250998@gmail.com.

Жаранкова Ю. С. – врач-детский онколог-гематолог, врач-детский аллерголог-иммунолог ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». E-mail: marukovich85@mail.ru.

Луцкович Д.В. – научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий. ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». E-mail: lutskovichdm@gmail.com.

Белевцев М.В. – к.б.н., зам. директора по научной работе ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». E-mail: belevtsev_m@mail.ru.

Поступила 3.01.2023 г.