



Гурьянова И.Е.✉, Любушкин А.В., Луцкович Д.В., Казак В.И., Коростелева Л.Б.,
Жаранкова Ю.С., Доронина И.Г., Скопонец Е.Я., Полякова Е.А., Белевцев М.В.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Метод диагностики наследственного ангиоотека, основанный на количественном определении копий гена SERPING1: результат его клинической апробации

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Гурьянова И.Е., Полякова Е.А., Луцкович Д.В., Белевцев М.В.; сбор материала – Гурьянова И.Е., Жаранкова Ю.С., Доронина И.Г.; обработка материала и выполнение лабораторных тестов – Любушкин А.В., Коростелева Л.Б., Полякова Е.А., Казак В.И.; статистическая обработка данных – Гурьянова И.Е., Любушкин А.В., Полякова Е.А.; написание текста – Гурьянова И.Е., Полякова Е.А.; редактирование – Гурьянова И.Е., Любушкин А.В., Скопонец Е.Я.

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

Подана: 29.11.2022

Принята: 27.02.2023

Контакты: guryanovairina85@gmail.com

Резюме

Введение. Наследственный ангиоотек – редкое генетическое заболевание с ауто-сомно-доминантным типом наследования, характеризующееся повторяющимися эпизодами скопления жидкости вне кровеносных сосудов, вызывающими отек тканей рук, ног, лица, мозговых оболочек, желудочно-кишечного тракта или дыхательных путей. В 99% всех случаев наследственный ангиоотек связан с недостаточностью (количественной – тип I или функциональной – тип II) ингибитора C1-эстеразы, вызванной патогенетическими нарушениями в гене SERPING1, кодирующем C1-ингибитор (OMIM #606860).

Цель. Разработать метод диагностики наследственного ангиоотека на основе количественного анализа копий гена SERPING1 и оценить эффективность клинического применения.

Материалы и методы. В исследование включено три группы: пациенты с наследственным ангиоотеком типа I (n=12), пациенты с наследственным ангиоотеком типа II (n=5), контрольная группа (n=50). Определение количества C1-ингибитора выполняли нефелометрическим методом, количественный анализ копий гена SERPING1 – методом ПЦР в режиме реального времени. Для выполнения количественного анализа копий гена SERPING1 созданы специализированные плазмидные стандарты. Результаты представлены в виде медианы (25%; 75%).

Результаты. Медиана копий гена SERPING1 относительно копий гена CD64 среди образцов пациентов с наследственным ангиоотеком типа I составила 264 032 (205 754; 392 769) копии; пациентов с наследственным ангиоотеком типа II – 739 222 (549 180; 757 991) копии; контрольной группы – 708 830 (559 830; 1 076 100) копий. Медиана



количества C1-ингибитора среди образцов пациентов с наследственным ангиоотеком типа I, наследственным ангиоотеком типа II и контрольной группы составила 0,054 (0,052; 0,068) г/л, 0,324 (0,308; 0,388) г/л и 0,278 (0,241; 0,308) г/л соответственно. Полученные результаты имеют высокую корреляционную взаимосвязь ($r=0,844$; $p<0,001$).

Выводы. Разработанный молекулярно-биологический метод исследования, основанный на количественном анализе копий гена SERPING1 в клетках периферической крови, следует рассматривать как новый, перспективный инструмент в диагностике наследственного ангиотека, доступный к выполнению во многих организациях здравоохранения Беларуси.

Ключевые слова: наследственный ангиоотек, C1-ингибитор, SERPING1, плазмидные стандарты, ПЦР в режиме реального времени, Беларусь

Irina E. Guryanova✉, Aliaksandr V. Liubushkin, Dmitry V. Lutskovich, Victoria I. Kazak, Ludmila B. Korosteleva, Yulia S. Zharankova, Inessa G. Doronina, Katsiaryna Ya. Skapavets, Ekaterina A. Polyakova, Mikhail V. Belevtsev
Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Diagnostic Method for Hereditary Angioedema Based on SERPING1 Gene Copies Quantitative Analysis: Clinical Testing Results

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept and design – Irina E. Guryanova, Ekaterina A. Polyakova, Dmitry V. Lutskovich, Mikhail V. Belevtsev; data collection – Irina E. Guryanova, Yulia S. Zharankova, Inessa G. Doronina; material processing and laboratory tests – Aliaksandr V. Liubushkin, Ludmila B. Korosteleva, Ekaterina A. Polyakova, Victoria I. Kazak; statistical processing – Irina E. Guryanova, Aliaksandr V. Liubushkin, Ekaterina A. Polyakova; text writing – Irina E. Guryanova, Ekaterina A. Polyakova; editing – Irina E. Guryanova, Aliaksandr V. Liubushkin, Katsiaryna Ya. Skapavets.

Funding. This work was financially supported by the State Program "Science-intensive Technologies and Engineering" of the Ministry of Health of the Republic of Belarus for 2021-2025 (Subprogram 5 "Chemical Products and Molecular Technologies"), the state registration number 20213494.

Submitted: 29.11.2022

Accepted: 27.02.2023

Contacts: guryanovairina85@gmail.com

Abstract

Introduction. Hereditary angioedema is a rare autosomal dominant disease characterized by episodic local swelling involving subcutaneous or submucous tissue in different parts of the body, including limbs, face, and throat. In 99% of cases, hereditary angioedema is caused by a deficiency (type I) or dysfunction (type II) of C1-inhibitor and associates with sequence variants in the SERPING1 gene (OMIM #606860).

Purpose. To develop a method for hereditary angioedema diagnosis based on quantitative analysis of SERPING1 gene copies and to evaluate the effectiveness of its clinical application.

Materials and methods. The study included three groups: patients with hereditary angioedema type I ($n=12$), patients with hereditary angioedema type II ($n=5$), and the

control group (n=50). C1-inhibitor antigen was measured by nephelometric method; quantitative analysis of SERPING1 gene copies was performed by real-time PCR; specialized plasmid standards were created to perform quantitative analysis of SERPING1 gene copies. The results are presented as a median (25%; 75%).

Results. The median of SERPING1 gene copies against CD64 gene copies among samples was the following: in patients with hereditary angioedema type I it comprised 264 032 (205 754; 392 769) copies; in patients with hereditary angioedema type II it comprised 739 222 (549 180; 757 991) copies; in controls, it comprised 708 830 (559 830; 1 076 100) copies. The median of C1- inhibitor antigen among patients with hereditary angioedema type I, hereditary angioedema type II and the control group was 0.054 (0.052; 0.068) g/l, 0.324 (0.308; 0.388) g/l, and 0.278 (0.241; 0.308) g/l respectively. The results obtained had a high correlation relationship ($r=0.844$; $p<0.001$).

Conclusions. Quantitative analysis of copies of the SERPING1 gene in peripheral blood cells should be considered as a new, promising biomarker in the diagnosis of hereditary angioedema, available for implementation in a large number of Belarusian health care centres.

Keywords: hereditary angioedema, C1-inhibitor, SERPING1, plasmid standards, real-time PCR, Belarus

■ ВВЕДЕНИЕ

Наследственный ангиоотек (HAO) – редкое (орфанное) потенциально угрожающее жизни заболевание, которое характеризуется рецидивирующими отеками кожи, слизистых/подслизистых оболочек и генетически детерминировано. Ключевую роль в развитии ангиоотечков при этом заболевании играет брадикинин, поэтому ангиоотеки у пациентов с HAO не чувствительны к стандартной терапии (системные глюкокортикостероиды, антигистаминные препараты, адреналин), применяемой для лечения пациентов с ангиоотеками, вызванными медиаторами тучных клеток, и требуют другой, патогенетически обоснованной терапии [1]. Нередко отек при HAO ошибочно принимают за аллергическую реакцию, ввиду чего применение эффективной терапии происходит не сразу. По этой причине риск смерти от отека верхних дыхательных путей у недиагностированных пациентов составляет $\approx 30\%$, а у диагностированных – около 1% [2].

В 99% всех случаев HAO связан с недостаточностью ингибитора C1-эстеразы (C1-INH-HAE), вызванной наличием патогенетических аллельных вариантов в гене SERPING1, кодирующем C1-ингибитор (OMIM #606860) [3]. В свою очередь, HAO ввиду дефицита C1-ингибитора подразделяют на два типа: количественный дефицит C1-ингибитора (HAO типа I) и функциональный дефицит C1-ингибитора (HAO типа II) [4]. Ожидаемая частота встречаемости HAO типа I и типа II в мире оценивается между 1:10 000 и 1:50 000, без расовых и половых различий [5]. В 1% всех случаев HAO не связан с недостаточностью ингибитора C1-эстеразы (nC1-INH-HAE), причиной которого являются либо патогенетические аллельные варианты в генах F12, PLG, ANGPT1, KNG1, MYOF, HS3ST6, либо неизвестные на данный момент нарушения (HAE-UNK) [6]. Несмотря на то, что nC1-INH-HAE ассоциирован с нарушениями в 6 различных генах, в литературе описано всего 600–700 случаев среди пациентов из Бразилии, Франции, Испании, Германии, Италии, США и Японии [7].



Все аллельные варианты, ассоциированные с НАО, выявлены в генах с низкой пенетрантностью, в результате чего у носителя патогенетического нарушения первый приступ НАО может развиваться без каких-либо клинических предпосылок и в любом возрасте. Считается, что C1-INH-NAE дебютирует до 20 лет, а nC1-INH-NAE – после 25–30 лет [8], однако описаны случаи более раннего или более позднего дебюта для каждой из групп [9, 10].

Для постановки диагноза НАО типа I и типа II в качестве скринингового теста используется определение компонента системы комплемента C4, затем выполняют уточняющие тесты: определение количества C1-ингибитора и его функциональной активности. НАО типа I характеризуется низким уровнем количества и функциональной активности C1-ингибитора, НАО типа II характеризуется нормальным или повышенным количеством, но низким уровнем функциональной активности C1-ингибитора [4, 6]. Однако даже у пациентов с генетически подтвержденным НАО типа I и типа II эти биохимические показатели могут оставаться в пределах интервала нормы, кроме того, на результаты исследований могут повлиять разнообразные факторы: острые и хронические инфекции, беременность, возраст до года, ошибки при транспортировке и хранении образцов и др., что нередко приводит к ложноположительным или ложноотрицательным результатам [11]. Кроме того, к настоящему времени при диагностике пациентов с nC1-INH-NAE среди лабораторных методов исследования единственным одобренным является генетическое тестирование [6].

На протяжении многих лет шли и все еще продолжают поиски эффективных биомаркеров, которые могли бы использоваться при диагностике НАО или его подтипа, при мониторинге приступов НАО, при оценке эффективности применяемой терапии, для подбора индивидуальных подходов лечения, а также для оценки вероятности клинического события в будущем [12]. На сегодняшний день известно около 70 биомаркеров, однако, несмотря на это, в настоящее время в клинической практике для диагностики и принятия решений применяются лишь некоторые лабораторные тесты (определение количества и функциональной активности C1-ингибитора, количества компонента системы комплемента C4) [12]. К сожалению, из этих основных трех тестов в Беларуси доступен к выполнению только тест определения количества компонента системы комплемента C4. Тест по определению функциональной активности C1-ингибитора не выполняется ни в одной лаборатории Беларуси, а тест по определению количества C1-ингибитора только в двух [13, 14].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать метод диагностики наследственной ангиоотека на основе количественного анализа копий гена SERPING1 и оценить эффективность клинического применения.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены образцы биологического материала от 50 человек 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. Помимо этого, в исследование включены образцы биологического материала от 17 пациентов с генетически подтвержденным НАО

(5 пациентов с НАО типа II и 12 пациентов с НАО типа I). Всем пациентам с НАО лечение и профилактика приступов заболевания не проводились на протяжении как минимум двух недель. Информированное согласие получено у всех пациентов и/или их официальных опекунов.

Определение количества C1-ингибитора

Определение количества C1-ингибитора выполняли с применением нефелометрического метода. Для данного теста использовали пробирки без антикоагулянта. Исследования проводились с использованием наборов реагентов N Antiserum to Human C1-Inhibitor (Siemens, Германия) и прибора Dade Behring BN ProSpec (Siemens, Германия).

Количественный анализ копий гена SERPING1

В качестве материала для исследования использовали цельную периферическую кровь, набранную в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА. РНК выделяли из мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции. Для контроля качества выделенной РНК использовали показатели оптической плотности 260/280 нм и 230/260 нм спектрофотометра/флуорометра серии DS-11 (DeNovix, США) [15].

Визуализацию наличия 18S и 28S субъединиц рибосомальной РНК проводили путем горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле. Синтез кДНК осуществляли строго из 1 мкг РНК. Для нормализации экспрессии использовали контрольный ген (CD64).

Количественный анализ копий гена SERPING1 выполняли методом ПЦР в режиме реального времени на базе амплификатора Bio-Rad CFX 96 (Bio-Rad, США) при поддержке программного обеспечения Real-time CFX Manager Software. Пороговый уровень (Threshold) – значение количества циклов реакции, при котором кривая амплификации и прямая порога чувствительности прибора пересекаются, устанавливали на 30-м цикле. Реакционная смесь включала: 10,0 мкл 2x MasterMix (Артбиотех, Беларусь); 5,0 мкл воды; 1,0 мкл смеси праймеров с концентрацией 6 пмоль для прямого и обратного праймеров и 4 пмоль флуоресцентной пробы (Праймтех, Беларусь). Для количественной ПЦР в режиме реального времени использовали серийные разведения линеаризированной плазмидной ДНК, содержащей последовательности генов CD64 и SERPING1, соответственно, с концентрацией 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 копий в 5 мкл. Для количественной оценки результатов использовали метод «стандартной кривой». Количество копий мРНК гена SERPING1 в каждом образце рассчитывали путем нормализации к количеству мРНК копий контрольного гена CD64 на 1 млн МНК по формуле [16]:

$$\text{Количество копий гена SERPING1} = \frac{\text{Среднее (SQ) SERPING1}}{\text{Среднее (SQ) CD64}} \times 10^6$$

Подбор нуклеотидной последовательности праймеров

В качестве внутреннего контроля выбрали ген CD64 (FCGR1A), который кодирует мембранный белок, специфичный для моноцитов (клеток, синтезирующих C1-ингибитор в составе гетерогенной популяции МНК). Праймеры подбирали



Таблица 1

Последовательности праймеров и флуоресцентных зондов, используемых для амплификации фрагментов контрольного гена CD64 и гена SERPING1 методом ПЦР в режиме реального времени
Table 1

Primer and fluorescent probes sequences used to amplify CD64 control gene segments and SERPING1 gene segments by real-time PCR

Название	Последовательность нуклеотидов (3';5')	t°отжига праймеров	Длина продукта (п. о.)	Флуорофор-гаситель
SERPING1_F	GTGCCCATGATGAATAGCAAG	57,36	255	–
SERPING1_R	GCTGGTCGTCACCTTTGATGC	59,83		–
SERPING1_probe	TGTGGCCCATTCATTGACCAAACTTTG	64,03		FAM- TAMRA
CD64_F	CGACCCCGAGCTACAGAATC	59,89	187	–
CD64_R	TTCCACGCATGACACCTCAA	59,89		–
CD64_probe	TCCACAGAGGCTGGCTACTACTGCA	64,03		HEX- TAMRA

Примечания: F – прямой праймер, R – обратный праймер.

к нуклеотидной последовательности 3-го экзона гена CD64 и 6-го экзона гена SERPING1 – кодирующие области генов с наименьшим числом нуклеотидных вариаций. Последовательности праймеров представлены в табл. 1. Последовательности праймеров с флуоресцентной пробой заимствованы из материалов статьи [16].

Для определения оптимальной температуры отжига праймеров выполняли амплификацию фрагментов методом ПЦР при температурном градиенте 57–63 °С. По результатам электрофореза в 1,5% агарозном геле определили, что оптимальной является температура отжига 61 °С.

Создание и получение калибраторов посредством клонирования амплифицированных фрагментов в плазмидный вектор

Плазмидные стандарты (калибраторы) необходимы для измерения уровня SERPING1 в абсолютных значениях копий. При создании плазмидных стандартов использовали вектор pTZ57_R Vector (Invitrogen, США), в который клонировали амплифицированные фрагменты контрольного гена CD64 и гена SERPING1. Для проектирования, моделирования и визуализации процедуры клонирования использовали программное обеспечение SnapGene Software (<https://www.snapgene.com/>). Нуклеотидные последовательности генов CD64 и SERPING1 амплифицировали методом ПЦР с использованием кДНК и специфичных праймеров (табл. 2), содержащих на 5' конце последовательности сайтов рестрикции эндонуклеаз EcoR1 и BamH1 (New England Biolabs, Великобритания) с соответствующим количеством фланкирующих нуклеотидов.

ПЦР проводили с использованием набора Taq Platinum (Invitrogen, США) и в условиях амплификации: 95 °С – 10 мин., затем 35 циклов (95 °С – 15 сек., 60 °С – 20 сек., 72 °С – 30 сек.), 72 °С – 5 мин., 4 °С – 10 мин.

Эффективность осуществленной ПЦР оценивали методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле. Очистку полученных в результате ПЦР ампликонов проводили набором реагентов PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen, США). Затем ПЦР-продукты и плазмидный вектор pTZ57_R Vector подвергали рестрикции эндонуклеазами EcoR1 и BamH1 (New England Biolabs, Великобритания). Далее продукты

Таблица 2
Последовательности праймеров, используемых для амплификации фрагментов с сайтами рестрикции методом ПЦР
Table 2
Primer sequences used to amplify segments with restriction sites by PCR

Название	Последовательность нуклеотидов (3'5')	Длина продукта (п. о.)
C1-INH _ EcoR1 _ F	CGC GAATTC GTGCCCATGATGAATAGCAAG	255
C1-INH _ BamH1 _ R	CCC GGATCC GCTGGTCGCTCACTTTGATGC	
CD64 _ EcoR1 _ F	CGC GAATTC CGACCCCAGCTACAGAATC	187
CD64 _ BamH1 _ R	CCC GGATCC TCCACGCATGACACCTCAA	

Примечания: F – прямой праймер, R – обратный праймер. Жирным шрифтом выделены сайты-рестрикции.

рестрикции вносили в лунки 2% агарозного геля, проводили электрофорез, полученные фрагменты вырезали, очищали с применением наборов реагентов QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, США). Концентрацию очищенных продуктов рестрикции определяли методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле с использованием маркера молекулярной массы 1 Kb GeneRuler DNA Ladder (Thermo Scientific, США).

Далее проводили лигирование с использованием набора Rapid DNA Ligation&Transformation Kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, США). Соединение ДНК-вставки с вектором осуществляли по «липким» концам, полученным в результате рестрикции ПЦР-продуктов и плазмидного вектора. Соотношение концентраций вставка/вектор определяли с помощью программы Ligation Calculator (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html). Реакция лигирования протекала 12 часов при температуре +4 °C.

Трансформированные лигазной смесью компетентные клетки (штамм DH5-α бактерии E. coli) вносили в ячейку для электропорации. Смесью подвергали воздействию электрического импульса с напряженностью 18–21 тыс. В/см с использованием прибора для электропорации бактерий MicroPulser (Bio-Rad, США). После импульса к клеткам добавляли 1 мл среды SOC (от англ. Super Optimal Catabolite Suppression Broth), переносили суспензию в пробирки объемом 1,5 мл и инкубировали при температуре +37 °C в течение 2 часов в термостате. По окончании инкубации клетки осаждали центрифугированием на общеклинической центрифуге при 3000 об/мин – 5 минут. Далее вносили культуру клеток в объеме 100 мкл на чашку Петри со специфической средой S-Gal (от англ. Salmon-GAL) с селективным антибиотиком ампицилином. Отбирали колонии белого цвета (лигирование прошло успешно) и культивировали в среде LB (от англ. Luria broth) с ампицилином при +37 °C в течение 12 часов. Из полученных клеток проводили выделение плазмидной ДНК с использованием набора PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit (LifeTechnologies, США).

Определение аутентичности плазмид со вставками от гена CD64 и от гена C1-ингибитора выполняли способом автоматического секвенирования по Сенгеру на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Использовали набор BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Анализ данных секвенирования проводили при помощи специализированного программного обеспечения Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems, США) и BioEdit (Bioedit Ltd, США).



Полученные аутентичные плазмиды переводили в линейную форму посредством рестрикции с эндонуклеазой Scal (New England Biolabs, Великобритания). Концентрацию полученных плазмид со вставкой определяли в 1,5% агарозном геле. Полученные значения концентрации и размера плазмиды использовали для расчета количества копий плазмидной ДНК в 1 мкл посредством приложения Calculator for determining the number of copies of a template (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>).

Далее проводили серию разведений плазмидных стандартов «pTZ57_R – CD64» и «pTZ57_R – SERPING1» с шагом в 10 раз от 10^6 до 10^3 копий в 5 мкл.

Статистический анализ

Статистический анализ данных выполняли с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Excel, GraphPad Prism 6 и Statistica 8.0 с применением критериев непараметрической статистики. Результаты представлены в виде медианы (25%; 75%) и медианы (min; max). Различия между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса. Достоверными считались события, для которых уровень значимости $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для расчета количества копий SERPING1 основным этапом является построение калибровочного графика в координатах $C_t - \log(N_0)$ с серией разведений плазмидных стандартов, на основании которого вычисляют концентрацию SERPING1 в образцах кДНК пациентов. Точность количественного определения напрямую связана с качеством стандартной кривой. Все параметры стандартных кривых амплификации используемых разведений находились в пределах нормы и представлены в табл. 3.

Эффективность ПЦР для контрольного гена составила 96,7% с коэффициентом корреляции $R^2=0,99$, для SERPING1 эффективность ПЦР составила 98,6% с коэффициентом $R^2=0,99$. Для оценки воспроизводимости результатов исследования с применением разработанного нами метода была проведена серия ПЦР в 10 повторях с 1 образцом ДНК. Результаты, полученные в процессе одной постановки реакции, были использованы для расчета внутрисерийной воспроизводимости. Результаты, полученные посредством 10 последовательных постановок реакции ПЦР в режиме реального времени, – для расчета межсерийной воспроизводимости. Коэффициент вариации является характеристикой внутрилабораторной конкордантности результатов. При коэффициенте вариации меньше 10% степень различий данных считается незначительной. При значении коэффициента вариации от 10% до 20% – средней.

Нами получены приемлемые результаты воспроизводимости для ПЦР в режиме реального времени, так, при оценке ΔC_t для внутрисерийной воспроизводимости

Таблица 3

Параметры стандартных кривых амплификации плазмидной ДНК SERPING1 и CD64

Table 3

Parameters of standard SERPING1 and CD64 plasmid DNA amplification curves

Мишень	Наклон	Интерсепт	Коэффициент корреляции R^2	Эффективность, %
SERPING1	-3,052	38,1	0,991	98,6
CD64	-3,086	37,7	0,991	96,7

коэффициент вариации составил 1,1–1,4%, для межсерийной 2,5–3,4. При оценке количественных значений внутри серии коэффициент вариации составил 4,5–10,9%, при оценке межсерийной воспроизводимости полученных результатов по количеству копий коэффициент составил 9,6–18,7%.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что разработанный и оптимизированный нами метод количественного определения копий гена SERPING1 обладает высокой эффективностью: высокой воспроизводимостью и сходимостью результатов.

При установлении диапазона физиологических значений копий гена SERPING1 в МНК периферической крови пациентов контрольной группы (пороговая линия на уровне 30 циклов) медиана Cq Mean гена CD64 составила 24,02 (диапазон: 20,43–26,39). Медиана (25%; 75%) копий гена C1-ингибитора (SERPING1) относительно копий гена CD64 среди образцов контрольной группы составила 708 830 (559 830; 1 076 100) (см. рисунок).

При выполнении количественного анализа копий гена SERPING1 в МНК периферической крови пациентов с НАО типа I и НАО типа II были получены следующие результаты: медиана Cq Mean гена CD64 у пациентов с НАО составила 23,61 (диапазон: 21,68–25,54); медиана (25%; 75%) копий гена C1-ингибитора (SERPING1) относительно копий гена CD64 среди образцов пациентов с НАО типа I и НАО типа II составила 264 032 (205 754; 392 769) копии и 739 222 (549 180; 757 991) копии соответственно (см. рисунок). При сравнении результатов определения копий гена SERPING1 у пациентов с НАО и результатов теста по определению количества C1-ингибитора с применением нефелометрического метода у тех же пациентов выявлена высокая корреляционная взаимосвязь ($r=0,844$; $p<0,001$; табл. 4).

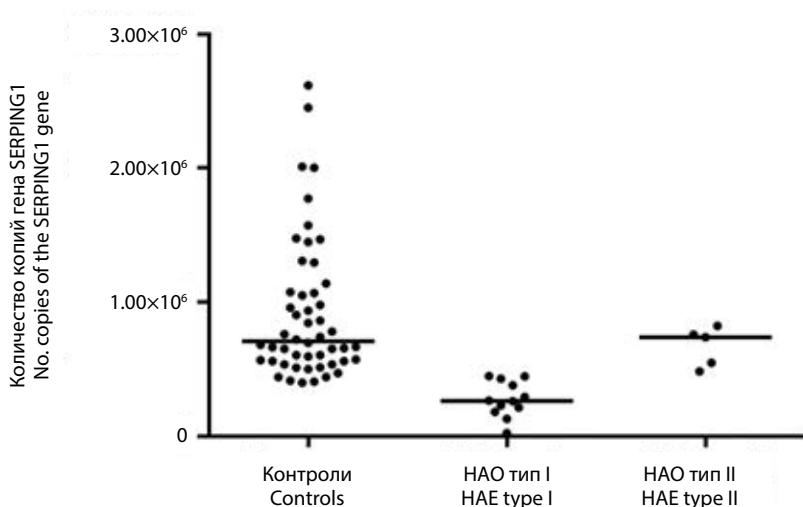


Схема графика результатов определения копий гена C1-ингибитора относительно контрольного гена в образцах контрольной группы, пациентов с НАО типа I и НАО типа II
Schematic diagram of C1 inhibitor gene copies number against the control gene in samples from the control group patients with HAE type I and HAE type II



Таблица 4
Результаты определения копий гена SERPING1 и результатов теста по определению количества C1-ингибитора
Table 4

Complement parameters of C1-inhibitor and number of SERPING1 gene copies

Группа	Количество пациентов	Количество копий гена SERPING1, медиана (25%; 75%)	Количество C1-ингибитора (г/л), медиана (25%; 75%)
НАО типа I	12	264 032 (205 754; 392 769)	0,054 (0,052; 0,068)
НАО типа II	5	739 222 (549 180; 757 991)	0,324 (0,308; 0,388)
Контроли	50	708 830 (559 830; 1 076 100)	0,278 (0,241; 0,308)
Критерий Краскела – Уоллиса		p<0,001	p<0,001

Примечание: диапазон нормальных значений C1-ингибитора равняется 0,21–0,39 г/л.

Таким образом, судя по полученным нами предварительным данным, количественный анализ копий гена SERPING1 в МНК периферической крови может стать перспективным инструментом в диагностике НАО, доступным к выполнению во многих организациях здравоохранения Беларуси.

■ ВЫВОДЫ

1. Точность количественного определения копий гена SERPING1 в образцах кДНК пациентов с использованием разработанного метода подтверждена параметрами качества стандартной кривой, коэффициентом вариации внутрисерийной и межсерийной воспроизводимости.
2. Установлен диапазон физиологических значений копий гена SERPING1 в мононуклеарах периферической крови контрольной группы относительно копий гена CD64, медиана (25%; 75%) которого составила 708 830 (559 830; 1 076 100) копий.
3. Медиана (25%; 75%) копий гена SERPING1 относительно копий гена CD64 среди образцов пациентов с НАО типа I и НАО типа II составила 264 032 (205 754; 392 769) копии и 739 222 (549 180; 757 991) копии соответственно.
4. Медиана (25%; 75%) количества C1-ингибитора среди образцов пациентов с НАО типа I, НАО типа II и контрольной группы составила 0,054 (0,052; 0,068) г/л, 0,324 (0,308; 0,388) г/л и 0,278 (0,241; 0,308) г/л соответственно.
5. При сравнении результатов копий гена SERPING1 среди пациентов с НАО и результатов теста по определению количества C1-ингибитора с применением нефелометрического метода у тех же пациентов выявлена высокая корреляционная взаимосвязь ($r=0,844$; $p<0,001$).

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Pampura A., Vitkovskaya I., Fomina D. Routing principles for patients with hereditary angioedema. *Ros Vestn Perinatol i Pediatr.* 2021;66(3):94–101. doi: 10.21508/1027–4065–2021–66–3–94–101. (in Russian)
2. Bork K., Hardt J., Witzke G. Fatal laryngeal attacks and mortality in hereditary angioedema due to C1-INH deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2013;130(3):692–697. doi: 10.1016/j.jaci.2012.05.055
3. Maas C., López-Lera A. Hereditary angioedema: insights into inflammation and allergy. *Mol. Immunol.* 2019;112:378–386.
4. Agostoni A. Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J. Allergy Clin Immunol.* 2004;114(3):51–131.

5. Manning M.E. Hereditary angioedema: Differential diagnosis, diagnostic tests, and family screening. *Allergy and Asthma Proceedings*. 2020;41(6):22–25. doi: 10.2500/aap.2020.41.200062
6. Maurer M. The international WAO/EAACI guideline for the management of hereditary angioedema – The 2021 revision and update. *Allergy*. 2022;77(7):1961–1990.
7. Bork K. Clinical features of genetically characterized types of hereditary angioedema with normal C1 inhibitor: a systematic review of qualitative Evidence. *Orphanet J Rare Dis*. 2020;289(15):1–14.
8. Sharma J., Jindal A.K., Banday A.Z., Kaur A., Rawat A., Singh S., Longhurst H. Pathophysiology of Hereditary Angioedema (HAE) Beyond the SERPING1 Gene. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2021;60(3):305–315. doi: 10.1007/s12016-021-08835-8
9. Veronez C.L. Hereditary Angioedema with Normal C1 Inhibitor and F12 Mutations in 42 Brazilian Families. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2018;6(4):1209–1216.e8. doi: 10.1016/j.jaip.2017.09.025
10. Guryanova I., Skapavets K., Liubushkin A., Polyakova E., Ausianik I., Aleshkevich S., Salivonchik A., Vertelko V., Zharankova Yu., Belevtsev M. Demographic characteristics of patients with genetically confirmed hereditary angioedema in the Republic of Belarus. *Immunopathology, allergology, infectology*. 2022;2:12–18. doi: 10.14427/jipai.2022.2.12. (in Russian)
11. Grumach A.S., Veronez C.L., Csuka D., Farkas H. Angioedema Without Wheals: Challenges in Laboratorial Diagnosis. *Front Immunol*. 2021;8:12:785736. doi: 10.3389/fimmu.2021.785736
12. Porebski G., Kwitniewski M., Reshef A. Biomarkers in Hereditary Angioedema. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021;60(3):404–415. doi: 10.1007/s12016-021-08845-6
13. C1-Esterase Inhibitor, C1-INH, level [Electronic resource]. Available at: <https://invitro.by/analizes/for-doctors/516/26740/> (accessed 28.11.2022).
14. Center services for citizens of the Republic of Belarus [Electronic resource]. Available at: <https://oncology.by/platnyie-uslugi/uslugi-czentra-laboratornaya-diagnostika.html> (accessed 28.11.2022).
15. DeNovix DS11 eBrochure [Electronic resource]. Available at: https://www.denovix.com/DeNovix_DS11_eBrochure.pdf (accessed 18.01.2023).
16. Pappalardo E., Zingale L.C., 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):638–44. doi: 10.1016/j.jaci.2004.06.021