

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

САВИЛОВ Александр Викторович

**РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В
ПРОГНОЗИРОВАНИИ РЕЦИДИВА КАЛЬЦИЙ-ОКСАЛАТНОГО
УРОЛИТИАЗА**

3.1.13. Урология и андрология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре урологии и андрологии факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель – **Камалов Армаис Альбертович** – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Официальные оппоненты – **Григорьев Николай Александрович** – доктор медицинских наук, профессор, исполняющий обязанности заведующего урологическим отделением АО «Европейский Медицинский Центр»

Паронников Михаил Валерьевич – доктор медицинских наук, заместитель начальника кафедры и клиники урологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации

Акопян Гагик Нерсесович – доктор медицинских наук, доцент, профессор Института урологии и репродуктивного здоровья человека Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «17» апреля 2025 г. в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.031.3 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, ул. Ломоносовский пр-т, д. 27, к. 10, учебный корпус Медицинского научно-образовательного института, 3 этаж, конференц-зал.

E-mail: dissovet.msu@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3368>

Автореферат разослан «__» марта 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат медицинских наук



А.Г. Плисюк

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Мочекаменная болезнь (МКБ) - это системная болезнь, в основе патогенеза которой лежит нарушение метаболизма и различные внешние факторы, а результатом воздействия данных факторов является образование конкрементов в почках [Мартов А.Г., 2020]. МКБ широко распространена во всем мире. Заболеваемость мочекаменной болезнью колеблется от 7 до 13% в Северной Америке, от 5 до 9% в Европе и от 1 до 5% в Азии [Wigner P., 2022]. Существуют лишь несколько мест в мире, где не регистрировались случаи МКБ – это прибрежные районы Японии и Гренландия [Каприн А.Д., 2022]. Отмечается прогрессивный рост заболеваемости МКБ в мире: за последние три десятилетия, а именно с 1990 по 2019 гг., рост составил 48,57%. В это же самое время произошло и увеличение смертности, связанной с МКБ [Qian X., 2022]. Если обратиться к статистическим данным в области урологических заболеваний в Российской Федерации (РФ), то МКБ по распространенности занимает третье место, уступая лишь инфекциям мочевых путей и заболеваниям предстательной железы. Данная статистика соответствует структуре заболеваемости в мире. При детальном рассмотрении заболеваемости МКБ в РФ с 2005 по 2019 гг. отмечен прирост последней на 35,45%. Такая же тенденция сохранялась и для пациентов с диагнозом, установленным впервые в жизни, с 2005 по 2019 гг. рост заболеваемости составил 14%. Снижение заболеваемости в 2020 г. можно связать с пандемией новой коронавирусной инфекцией, остановкой диспансеризации и перепрофилированием урологических отделений стационаров [Каприн А.Д., 2022]. Среди всех урологических заболеваний, приводящих к инвалидизации, МКБ занимает одну из ведущих позиций, замыкая четверку лидеров с долей до 14,4%, причем у 76% из них - единственная почка, а 90% - люди трудоспособного возраста [Lin W.Y., 2009].

Самым распространенным по химическому составу видом конкрементов являются кальцийсодержащие, составляющие до 75% от всех видов, причем 50%

из них относятся к кальций-оксалатным, 5% состоят их фосфата кальция и 45% относятся к смешанному варианту [Chaudhary A., 2010].

Несмотря на значительные успехи в оперативном лечении, МКБ характеризуется рецидивирующим и пожизненным характером. При отсутствии метафилактики, вероятность рецидива заболевания достигает от 10 до 23%, причем через 5-10 лет после манифестации она составляет уже 50%, а через 20 лет - 75% [Wigner P., 2022]. Учитывая эти особенности, МКБ тяжелым бременем ложится на бюджеты стран. Так в США ежегодный рост расходов на обследование и лечение пациентов с уролитиазом оценивается в 1,24 млрд долларов [Ziemba J., 2017].

На сегодняшний день современные способы и стратегии метафилактики МКБ в значительной степени отстают от прогресса в оперативном лечении. Возможно, это связано с тем, что многочисленные факторы, приводящие к образованию конкрементов, в настоящее время недостаточно изучены. Не так давно появилась информация, что всемирная организация здравоохранения проинформировала общественность, что течение любой неинфекционной хронической нозологии зависит до 55% от образа жизни, до 25% от экологии, до 15% от генетики и системы здравоохранения [Miyazawa K., 2011]. Длительное время проводятся исследования по изучению генетических факторов при МКБ. Так ещё в XIX веке была выявлена семейная предрасположенность к кальций-оксалатной форме уролитиаза. В ряде исследований, проведенных в последние годы, было выявлено, что наследуемость клинических форм МКБ у близнецов может достигать 56% [Goldfarb D., 2018]. Общая вероятность наследования МКБ у близких и более дальних родственников составляет от 15 до 65 процентов [Monico C., 2011]. Для идентификации генетических факторов риска чаще всего применяется «genome-wide association study» – GWAS («полногеномный поиск ассоциаций»). Данное исследование применяется в том числе и для МКБ, т.к. оно помогает выявить однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) различных генов, функционально связанных с манифестацией и рецидивом уролитиаза [Тивтикян А., 2022]. SNPs являются наиболее распространенными популяционно-

зависимыми генетическими вариациями. Современные подходы к метафилактике МКБ включают проведение молекулярно-генетического исследования на предмет наличия SNPs, без которого персонализированный подход к пациентам с уролитиазом невозможен.

Степень разработанности темы исследования. В мире за последнее десятилетие проведен ряд работ по поиску ассоциаций различных SNPs с развитием МКБ. Были изучены однонуклеотидные полиморфизмы следующих генов: рецептора витамина Д (VDR), Клото (KL), Клаудина 14 (CLDN14), Клаудина 16 (CLDN16), Клаудина 19 (CLDN19), альфасубъединицы ядерного рецептора эстрогенов (ESR), внеклеточного кальций-чувствительного рецептора (CASR), рецептора кальцитонина (CALCR), натрий-зависимого фосфатного транспортера (SLC34A) модулятора активатора высвобождения кальция 1 (ORAICASR1), рецептора фактора некроза опухолей 11Б (TNFRSF11B), фактора некроза опухолей 11(TNFSF11), мембранного анионного транспортера семейства 26 (SLC26A6). Однако выявленные ассоциации с МКБ SNPs генов были различные, что связано с критериями отбора пациентов для основных групп, которые отличались в каждом исследовании: пациенты с установленным диагнозом МКБ, имеющие отягощенный по уролитиазу родственный анамнез, страдающие МКБ и имеющие множественные конкременты обеих почек, страдающие МКБ и имеющие одинаковый по химическому составу конкременты. Точкой приложения выше указанных генов является воздействие на обмен кальция. В нашем исследовании были изучены SNP в генах, влияющих на гомеостаз кальция, с возможным последующим развитием рецидива МКБ: гена рецептора фактора некроза опухолей 11Б или остеопротегерина (rs3134057), гена альфасубъединицы ядерного рецептора эстрогенов (rs851982), ген рецептора витамина Д (rs1540339), ген кальций чувствительного рецептора (rs2202127), ген Клото (rs526906). Ген рецептора фактора некроза опухолей 11Б или остеопротегерина (TNFRSF11B, rs3134057) играет важную роль в метаболизме костной ткани, являясь рецептор-приманкой для RANKL (RANK/RANKL/OPG), участвует в ингибировании остеокластогенеза и костной резорбции [Wei K.,

2016]. Полиморфизм гена остеопротегерина может приводить к уменьшению минеральной плотности костной ткани, что, в свою очередь, может вызывать гиперкальциемию и гиперкальциурию [Marangella D., 2011]. Ген рецептора витамина D (VDR) также является одним из основных регуляторов гомеостаза кальция. Клетки VDR находятся в почках, кишечнике и костной ткани. В функциональном плане они взаимодействуют с VD3-зависимой экспрессией таких генов как: ген кальций-чувствительного рецептора, ген остеопонтинина и ген Клото. Действие этих клеток заключается в опосредованном влиянии на реабсорбцию кальция и фосфора путем через энтероциты и клетки почечных канальцев. При однонуклеотидном полиморфизме гена VDR (rs1540339) меняется степень выраженности проявлений данного гена и время его частичного разрушения [Тивтикян А., 2022]. Ген альфасубъединицы ядерного рецептора эстрогенов (ESR1) принимает активное участие в метаболизме костной ткани. Экспрессия ESR1 происходит на поверхности остеобластов, остеоцитов и остеокластов. ESR1 стимулирует синтез остеобластов и снижает костную резорбцию. При SNP ESR1 (rs851982) может происходить развитие явление остеопороза, что является фактором риска развития МКБ [Yang C., 2019]. Ген кальций-чувствительного рецептора обладает максимальной экспрессией в паращитовидной железе и почечных канальцах. Его воздействие обусловлено ингибированием цАМФ в паращитовидной железе, что приводит к снижению экскреции фосфатов, а также уменьшением пассивной и активной реабсорбции кальция в петле Генле [Ba J., 2003; Gamba G., 2009]. Ген Клото (Klotho) представляет собой β -глюкоронидазу, экспрессируется почками и участвует в гомеостазе кальция и фосфора. При SNP ESR1 (rs526906) отмечается усиление синтеза белка Клото, повышение экскреции фосфатов и кальция почками [Bostrom M., 2010].

В настоящий момент доказательная база генетических факторов, оказывающих влияние на патогенез МКБ в полном объеме не сформирована [Тивтикян А., 2022]. Изучение роли наследственных факторов при

рецидивирующем уролитиазе представляет особый интерес для выявления новых способов метафилактики МКБ.

Предотвращение рецидивов или метафилактика уролитиаза в группах риска экономически оправданна и эффективна. В связи с этим в последние годы в мире одним из основных аспектов изучения проблемы мочекаменной болезни является поиск генетических факторов риска манифестации и рецидива.

Цель исследования – выявить влияние молекулярно-генетических факторов, контролирующих кальциевый обмен, на развитие рецидива заболевания у пациентов с кальций-оксалатным уролитиазом.

Задачи исследования:

1. Выявить полиморфные аллели и (или) генотипы генов: TNFRSF11B (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B, или остеопротегерин; rs3134057), ESR1 (Estrogen receptor isoform 1; rs851982), VDR (Vitamin D receptor; rs1540339), CASR (Calcium-sensing receptor; rs2202127), KL (Klotho protein; rs526906)), ассоциированные с рецидивом кальций-оксалатного уролитиаза.

2. Установить влияние комбинаций аллельных вариантов исследуемых генов и клинических показателей на риск развития рецидива кальций-оксалатного уролитиаза.

3. Определить влияние полиморфизма гена TNFRSF11B (остеопротегерин; rs3134057) на показатели сывороточного остеопротегерина при рецидиве кальций-оксалатного уролитиаза.

4. Выявить связь рецидива кальций-оксалатного уролитиаза и концентрации сывороточного остеопротегерина в крови.

5. Определить прогностическую значимость использования сывороточного остеопротегерина в качестве маркера МКБ.

Объект исследования: пациенты с рецидивом кальций-оксалатного уролитиаза.

Научная новизна исследования. Данное клиническое исследование направлено на поиск новых предикторов развития рецидива кальций-оксалатного уролитиаза. Это первое проспективное исследование в Российской

Федерации, в котором изучалась взаимосвязь между определенными полиморфными вариантами генов, ассоциированных с уролитиазом, и уровнем остеопротегерина в сыворотке крови у пациентов с кальций-оксалатным уролитиазом.

В представленной работе впервые идентифицирован полиморфный вариант rs3134057 гена остеопротегерина, кодирующего рецептор фактора некроза опухолей 11Б, как полиморфизм, достоверно связанный с рецидивом кальций-оксалатного уролитиаза. Также впервые выявлено, что концентрация остеопротегерина в сыворотке крови достоверно ассоциирована с развитием рецидива кальций-оксалатного уролитиаза.

Теоретическая значимость исследования. Результаты настоящей работы могут быть использованы для дальнейших исследований, направленных на выявление индивидуальных генетических особенностей пациентов с рецидивирующим кальций-оксалатным уролитиазом. Гетерозиготный вариант гено типа гена *TNFRS11B rs3134057* может быть принят во внимание как предиктор рецидивирующей формы кальций-оксалатного уролитиаза. Повышение уровня остеопротегерина в сыворотке крови может быть использовано в качестве предиктора рецидива кальций-оксалатной формы уролитиаза.

Практическая значимость исследования. Ассоциация гетерозиготного варианта гено типа гена *TNFRS11B rs3134057* с рецидивом кальций-оксалатного уролитиаза может быть использована для определения групп повышенного риска рецидива заболевания среди пациентов, страдающих данной формой МКБ. С учетом статистически значимого повышения уровня остеопротегерина сыворотки крови при рецидиве кальций-оксалатной формы уролитиаза, данный показатель может применяться в качестве маркера рецидива заболевания, что также способствует выбору оптимальной тактики лечения и улучшению результатов лечения пациентов. Это может позволить снизить затраты системы здравоохранения на лечение поздно диагностированных и осложненных случаев рецидива МКБ, имеющих кальций-оксалатную природу конкрементов.

Методология и методы исследования. Диссертационное исследование является клиническим. Основную клиническую часть работы составляют итоги обследования и лечения пациентов с кальций-оксалатным уролитиазом, проходивших стационарное лечение в Университетской клинике МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, ГБУЗ «ГКБ №31 им. Академика Г.М. Савельевой ДЗМ», ФКУ «ЦВКГ имени П.В. Мандрыка» Минобороны РФ с января 2021 года по январь 2022 года. Первоначально в исследование было включено 235 пациентов с МКБ, однако после уточнения анамнеза заболевания, проведения инструментальных и лабораторных методов обследования (в том числе инфракрасная спектроскопия с определением химического состава конкремента, УЗИ и МСКТ мочевыделительной системы), применения критериев включения и исключения в работе остался 101 пациент с кальций-оксалатной формой уролитиаза.

Лабораторные методы диагностики выполнялись на базе отдела лабораторной диагностики Университетской клиники МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова. Выявление однонуклеотидных полиморфизмов в изучаемых генах осуществлено при помощи метода ПЦР на устройстве Real-time CFX96 Touch. Для оценки уровней остеопротегерина в сыворотке применили иммуноферментный анализ с набором Human OPG ELISA kit ab100617 от компании «Abcam» (Кембридж, Великобритания), следуя инструкциям производителя.

Для статистической обработки собранных данных использовались программы SNPstats (Institut Català d'Oncologia, Испания) и IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp., США).

Личный вклад автора. Автором в координации с научным руководителем создан дизайн работы, определены цели и задачи исследования. Автором самостоятельно произведен отбор пациентов, сбор клинического материала, составлена база пациентов, организованы необходимые исследования, проведена систематизация, структуризация и анализ результатов.

Самостоятельно изложено заключение научной работы: положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации.

Положения, выносимые на защиту, были изложены в научных статьях, опубликованных соискателем в соавторстве. В статье [1] автором проведен анализ ассоциации МКБ и генетических факторов, оказывающих влияние на синтез ряда гормонов, различных биологически активных молекул или факторов. Авторству соискателя принадлежат разделы статьи на с. 35-36. В статье [2] автор провел современную оценку наследственных факторов, оказывающих значительное влияние на манифестацию или рецидив МКБ. При подготовке главы 1 были использованы материалы из статьи [2]. Авторству соискателя принадлежат подразделы: «SNPs, влияющие на образование матрикса мочевых камней» (с. 77-79). В статье [3] автором изложены результаты генотипирования пациентов с кальций-оксалатным уролитиазом на предмет выявления однонуклеотидных полиморфизмов генов, влияющих на гомеостаз кальция в организме человека. Материалы из данной статьи были использованы для подготовки глав 1, 2, 3, 4 диссертации, а также в качестве обоснований положений, выносимых на защиту № 1 и 2. Авторству соискателя принадлежат разделы статьи на с. 56-57, с. 58-60. В статье [4] автором была проведена оценка концентрации остеопротегерина, как продукта гена остеопротегерина, у пациентов с кальций-оксалатным уролитиазом. Полученные данные были использованы для подготовки глав 1, 2, 3, 4 диссертации. Также материал из данной статьи использован в качестве обоснований положений, выносимых на защиту № 3 и 4. Авторству соискателя принадлежат разделы статьи на с. 80-84.

Положения, выносимые на защиту:

1. Рецидивирующее течение кальций-оксалатного уролитиаза ассоциировано с наличием полиморфного варианта гена остеопротегерина (rs3134057).
2. Рецидивирующее течение кальций-оксалатного уролитиаза ассоциировано с наличием полиморфного варианта гена Клото (rs526906).

3. Отсутствует взаимосвязь между повышенной концентрацией остеопротегерина в сыворотке крови и наличием полиморфного варианта гена остеопротегерина (rs3134057), ассоциированного с рецидивом кальций-оксалатного уролитиаза.

4. При рецидиве кальций-оксалатного уролитиаза отмечается достоверное повышение уровня сывороточного остеопротегерина.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов исследования базируется на достаточном объеме клинического материала, использовании передовых методов лабораторной диагностики, а также современном программном обеспечении для проведения статистической обработки: SNPstats (Institut Català d'Oncologia, Испания) и IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp., США).

Материалы диссертационного исследования представлены на XX Конгрессе российского общества урологов, Москва, 2020¹; XXIII Конгрессе российского общества урологов, Казань, 2023^{2 3}; XVI Конгрессе «Мужское здоровье», Сочи, 2020⁴; XVII Конгрессе «Мужское здоровье», Сочи, 2021⁵; XIX Конгрессе «Мужское здоровье», Сочи, 2023. По теме диссертации опубликовано 4 статьи: 2 – в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базе Scopus, 2 – в журналах, индексируемых в RSCI. Апробация работы проведена на заседании кафедры урологии и андрологии факультета фундаментальной

¹ Остеопротегерин, как новый маркер манифестации и рецидива мочекаменной болезни / Охоботов Д.А., Савилов А.В., Тивтикян А.С., Самоходская Л.М., Козлова П.С., Афанасьевская Е.В., Шершнева С.П., А.А. Камалов // Сборник тезисов материалы XX конгресса российского общества урологов. – 2020.

² Новые генетические факторы рецидивирующего уролитиаза / А.В. Савилов, М. Джайн., Д.М. Анохин, М.Е. Коцепуга, А.С. Тивтикян, Л.М. Самоходская, Д.А. Охоботов, С.П. Шершнева, А.А. Камалов // Сборник тезисов XXIII Конгресса Российского общества урологов. – 2023.

³ Остеопротегерин – перспективный маркер рецидива мочекаменной болезни / А.В. Савилов, М. Джайн., Д.М. Анохин, М.Е. Коцепуга, А.С. Тивтикян, Л.М. Самоходская, Д.А. Охоботов, С.П. Шершнева, А.А. Камалов // Сборник тезисов XXIII Конгресса Российского общества урологов. – 2023.

⁴ Генетические аспекты камнеобразования у пациентов с рецидивирующими формами нефролитиаза // Охоботов Д.А., Тивтикян А.С., Тарасова А.А., Камалов Д.М., Савилов А.В., Козлова П.С., Кисораускас Р.О., Стригунов А.А., Камалов А.А. Сборник трудов XVI конгресса «Мужское здоровье». – 2020.

⁵ Новые маркеры манифестации и рецидива мочекаменной болезни / Охоботов Д.А., Савилов А.В., Тивтикян А.С., Тарасова А.С., Самоходская Л.М., Камалов А.А., Шершнева С.П. // Сборник трудов XVII Конгресса “Мужское здоровье”. – 2021.

медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М. В. Ломоносова (19.09.2024 г.).

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, включающих 23 параграфа и 13 подпараграфов, а также заключения, библиографии, включающей 109 наименований, и списка иллюстративного материала, включающего 47 наименований.

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для проведения исследования в общую выборку было включено 235 пациентов, проходивших лечение в урологических отделениях Университетской клиники МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «ГКБ № 31 Департамента здравоохранения города Москвы» и федерального казенного учреждения «ЦВКГ имени П.В. Мандрыка» Министерства обороны РФ по поводу мочекаменной болезни. В ходе комплексного обследования пациентам была проведена инфракрасная спектроскопия с определением химического состава конкремента, в результате чего было исключено 114 пациента с конкрементами другого состава: смешанный состав (уратно-оксалатные конкременты) – 65 участников, кальций-фосфатный состав камня – 17 человек, уратные конкременты – 30 участников, струвитные камни – 2 пациента. В дальнейшем 20 участников были выведены из исследования по причине: выраженного нарушения пассажа мочи из верхних мочевых путей (13 пациентов), синдрома мальабсорбции (3 участника), гиперпаратиреоза первичного (4 человека). Из оставшихся 121 пациента 20 были исключены: 4 человек был диагностирован первичный гиперпаратиреоз, у 3 человек был выявлен синдром мальабсорбции (на фоне хронического панкреатита), у 13 человек было выявлено выраженное нарушение уродинамики (стриктура мочеточника, уретеро-вазальный конфликт) с развитием вторичной формы МКБ (таблица 1, рисунок 1).

Таблица 1.

Распределение пациентов по причинам МКБ на этапе формирования основных групп

Пациенты с идиопатическим кальций-оксалатным уролитиазом, n(%)		Другие варианты МКБ (исключены из исследования), n(%)	
Рецидивирующее течение	73 (31,1%)	Смешанная форма МКБ	65 (27,7%)

Пациенты с идиопатическим кальций-оксалатным уролитиазом, n(%)		Другие варианты МКБ (исключены из исследования), n (%)	
Перенесенный единичный эпизод почечной колики с последующим оперативным лечением или самоотхождением кальций-оксалатного конкремента (на момент исследования конкрементов в мочевыделительной системе нет)	28 (11,9%)	Уратный уролитиаз	30 (12,8%)
		Фосфатные камни	17 (7,2%)
		Струвитные конкременты	2 (0,8%)
		Первичный гиперпаратиреоз	4 (1,7%)
		Синдром мальабсорбции	3 (1,3%)
		Нарушение уродинамики верхних мочевыводящих путей	13 (5,5%)
Всего 235 человек с МКБ (100%)			

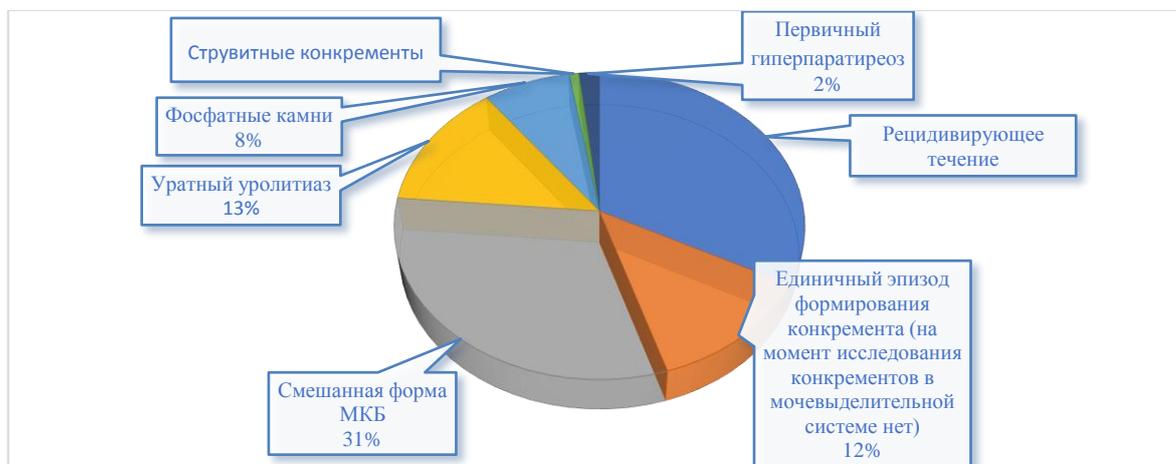


Рисунок 1. Распределение пациентов по причинам развития МКБ при формировании основных групп.

Все пациенты с кальций-оксалатной формой уролитиаза были разделены на две группы. В первую группу вошли пациенты с рецидивирующей формой кальций-оксалатного уролитиаза, причем на момент исследования был фиксирован рецидив данной формы заболевания. Во вторую группу были включены пациенты, которые ранее перенесли единичный эпизод почечной

колики с последующим оперативным лечением или самостоятельным отхождением кальций-оксалатного конкремента, определенного методом инфракрасной спектроскопии, и на момент исследования камней в мочевыделительной системе не имели. Контрольная группа состояла из 51 человека, не страдающего мочекаменной болезнью, семейный анамнез которых также не был отягощен данным заболеванием (рисунок 2).

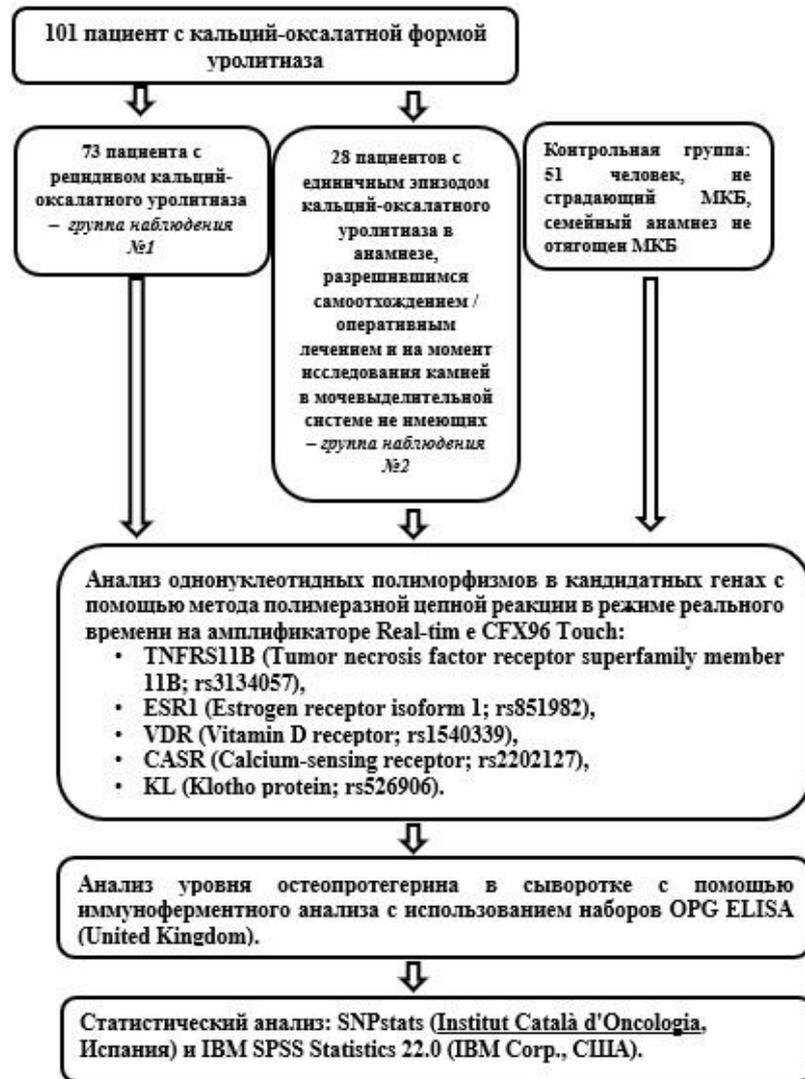


Рисунок 2. Схема дизайна исследования.

Всем пациентам, участвующим в исследовании, проводились сбор анамнеза и физикальное обследование. Сбор анамнеза был проведен для определения возраста пациента, даты первичного установления диагноза МКБ, уточнения истории заболевания и методов лечения, которые ранее применялись. Уточнение сопутствующих заболеваний (при наличии), наличие различных

вредностей (в т.ч. профессиональной) имело немаловажное значение. Физикальное обследование проводилось на каждом этапе работы.

Также всем пациентам, участвующим в исследовании, проводилось комплексное поэтапное обследование, включавшее стандартный спектр исследований при МКБ и в том числе стандартный общетерапевтический спектр для оценки общесоматического состояния пациентов и сопутствующих заболеваний.

Основное обследование (рисунок 2):

- Лабораторные исследования: общий клинический анализ крови, общий клинический анализ мочи (с проведением микроскопии осадка), биохимический анализ крови, микробиологическое исследование мочи с определением чувствительности к антибиотикам, ИК-спектроскопия (уточнение химического состава конкремента).
- Инструментальные исследования: ультразвуковое исследование органов мочевыделительной системы, мультиспиральная компьютерная томография органов мочевыделительной системы.

Дополнительное обследование (специальное) (рисунок 2):

- Анализ однонуклеотидных полиморфизмов в кандидатных генах: TNFRSF11B, ESR1, KL, VDR, CASR;
- Анализ уровня остеопротегерина в сыворотке крови.

Также всем пациентам для исключения избыточной массы тела или ожирения и, как следствие, возможного влияния данного показателя на рецидивирующее течение уролитиаза, был определен индекс массы тела (ИМТ). Для того чтобы вычислить ИМТ, необходимо массу тела в килограммах разделить на рост в метрах, возведенный в квадрат.

Далее пациентам каждой из групп сравнения было выполнено молекулярно-генетическое исследование с помощью метода ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе Real-time CFX96 Touch. Целью

исследования стало определения наличия возможных однонуклеотидных полиморфизмов генов TNFRSF11B, ESR1, KL, VDR, CASR. Интерес к данным полиморфизмам определялся тем, что по результатам ранее проведенных исследований, в частности, в НИИ Урологии им. Н.А. Лопаткина была диагностирована распространенность выше указанных мутаций на территории РФ [Аполихин О., 2016; Аполихин О., 2017; Константинова О., 2017].

На следующем этапе в каждой из групп был проведен анализ уровня остеопротегерина в сыворотке с помощью иммуноферментного анализа с использованием наборов OPG ELISA (United Kingdom). Интерес к исследованию уровня сывороточного остеопротегерина обусловлен результатами работы Dayarule S. и др., опубликованной в 2021 году, где было выявлено достоверно значимое повышение уровня сывороточного ОПГ ($p < 0,0001$) при уrolитиазе [Dayarule S., 2021].

В заключении для оценки результатов исследования был проведен статистический анализ, полученных данных: SNPstats (Institut Català d'Oncologia, Испания) и IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp., США).

Результаты исследования и обсуждение

Результаты проведения молекулярно-генетического исследования в группе наблюдения №1.

При анализе полученных результатов с использованием статистических методов для гена остеопротегерина (rs3134057) получено, что различия в частоте гомозиготного мажорного генотипа и частоте суммы гетерозиготного и гомозиготного минорного генотипов в контрольной выборке и выборке пациентов с рецидивом кальций-оксалатного уrolитиаза (группа наблюдения №1) являются достоверными: отношение шансов (ОШ) – 1,92; доверительный интервал (ДИ): 1,05–3,52; $p = 0,03$ (рисунок 3). Для гена альфасубъединицы ядерного рецептора эстрогенов (rs851982) выявлено, что отличия в частоте суммы гомозиготного дикого и гетерозиготного генотипов и частоте

гомозиготного мутантного генотипа в контрольной выборке и выборке пациентов с рецидивом кальций-оксалатного уролитиаза (группа наблюдения №1) являются недостоверными: отношение шансов (ОШ) – 1,42; доверительный интервал (ДИ): 0,79–2,54; $p = 0,24$. Для гена Клоута (rs526906) выявлено, что отличия в частоте суммы гомозиготного дикого и гетерозиготного генотипов и частоте гомозиготного мутантного генотипа в контрольной группе и группе пациентов с рецидивом кальций-оксалатного уролитиаза (группа наблюдения №1) являются достоверными: отношение шансов (ОШ) – 3,17; доверительный интервал (ДИ): 1,26–7,96; $p = 0,013$ (рисунок 4). Для гена рецептора витамина Д (rs1540339) получены данные о различии в частоте суммы гомозиготного мажорного и гетерозиготного генотипов и частоте гомозиготного минорного генотипа в контрольной выборке и выборке пациентов с рецидивом кальций-оксалатного уролитиаза (группа наблюдения №1) являются недостоверными: отношение шансов (ОШ) – 1,73; доверительный интервал (ДИ): 0,54 – 5,55; $p = 0,34$. Для гена внеклеточного кальций-чувствительного рецептора (rs2202127) выявлено, что отличия в частоте суммы гомозиготного дикого и гетерозиготного генотипов и частоте гомозиготного мутантного генотипа в контрольной выборке и выборке пациентов с рецидивом кальций-оксалатного уролитиаза (группа наблюдения №1) являются недостоверными: отношение шансов (ОШ) – 0,88; доверительный интервал (ДИ): 0,5–1,57; $p = 0,67$. Результаты статистического анализа представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Результаты статистического анализа для группы наблюдения №1

Ген	SNP	Генотип	ОШ (95% ДИ)	Значение p
TNFRSF11B	rs3134057	AA vs. AG+GG	1,92 (1,05 – 3,52)	0,031
ESR1	rs851982	TT+TC vs. CC	1,42 (0,79 – 2,54)	0,24
VDR	rs1540339	CC+ TC vs. TT	1,73 (0,54 – 5,55)	0,34

CASR	rs2202127	GG vs. GA+AA	0,88 (0,50 – 1,57)	0,67
KL	rs526906	AA+AG vs. GG	3,17 (1,26 – 7,96)	0,013

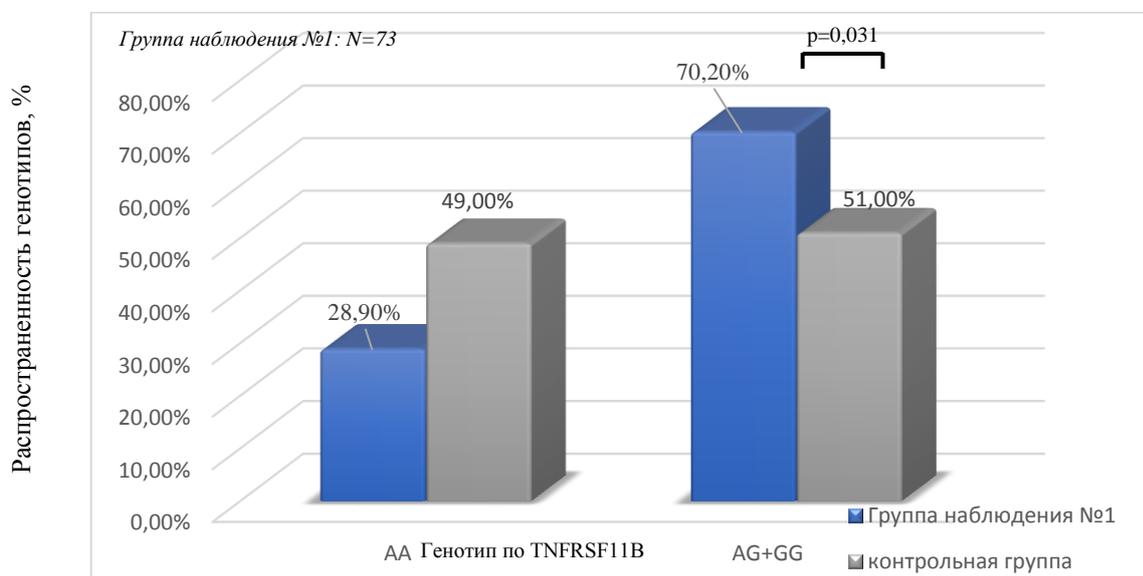


Рисунок 3. Распределение по генотипам (AA vs. AG+GG) для гена TNFRSF11B (rs3134057).

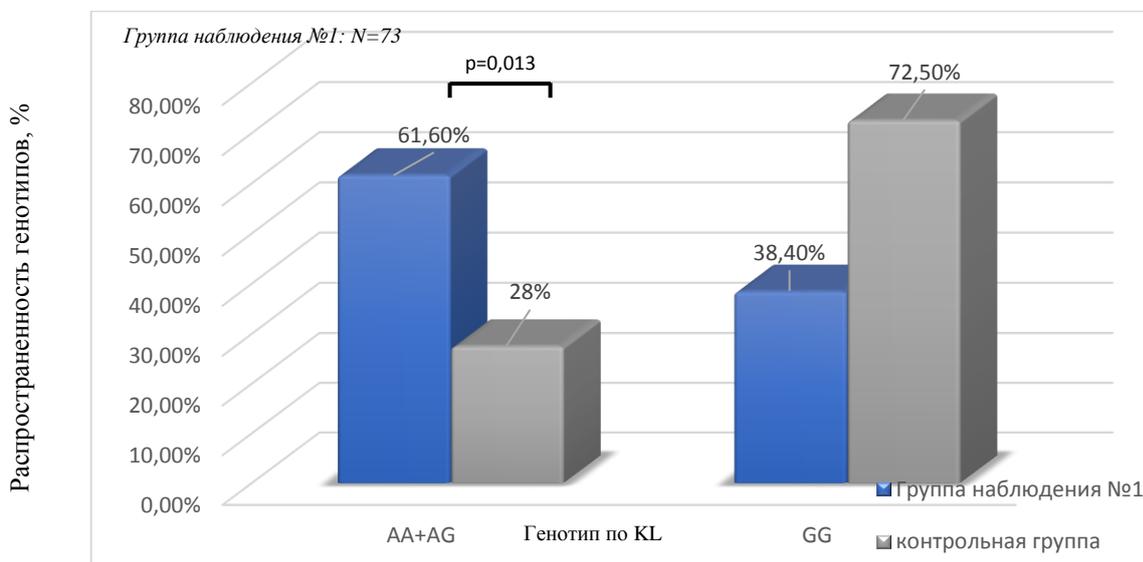


Рисунок 4. Распределение по генотипам (AA+AG vs. GG) для гена KL (rs526906).

Результаты исследования уровня сывороточного остеопротегерина у пациентов в группах сравнения.

В ходе анализа полученных результатов среди исследуемых групп не было выявлено достоверных различий по всем заявленным в исследовании клинико-демографическим параметрам (значение $p > 0,05$). При проведении ИФА всем участникам исследования удалось успешно определить уровни ОПГ. Статистический анализ показал, что в группе наблюдения №1 уровень ОПГ был достоверно выше, чем в контрольной группе (9,02 (4,63; 11,36) против 3,635 (0,9675; 9,295), $p = 0,012$). Разница в медиане показателей уровня ОПГ между группой наблюдения №1 и контрольной группой составила 148,1%. Между группой наблюдения №2 и контрольной группой статистически значимых отличий в уровне ОПГ не выявлено (4,71 (3,18; 10,41) против 3,635 (0,9675; 9,295), $p > 0,05$). При сравнении уровней ОПГ в группе наблюдения №1 и группе наблюдения №2 статистический анализ показал, что в группе наблюдения №1 уровень ОПГ был достоверно выше, чем в группе наблюдения №2 (9,02 (4,63; 11,36) против 4,71 (3,18; 10,41), $p = 0,29$). Разница в медиане показателей уровня ОПГ между группой наблюдения №1 и группой наблюдения №2 составила 91,5%. Результаты определения уровня сывороточного ОПГ представлены на рисунке 5.

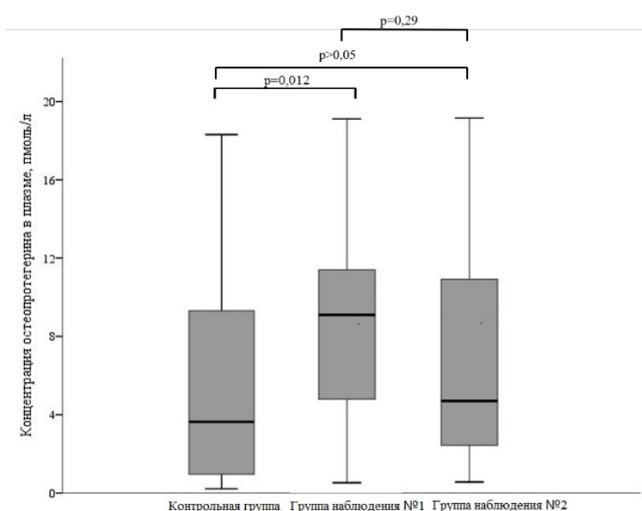


Рисунок 5. Сравнение концентрации сывороточного ОПГ в основных и контрольной группах.

В ходе исследования проведен ROC-анализ, целью которого была оценка полученных результатов уровней ОПГ в сыворотке крови. ROC-анализ выполнен во всех группах, принимающих участие в исследовании. Результаты представлены на рисунке 6. Площадь под ROC-кривой составила 0,657, что свидетельствует о низком дискриминирующем потенциале. Чувствительность ОПГ составила 78%, специфичность ОПГ была равна 52%. Порогового значения ОПГ, при котором проводился анализ составляло 2,7 пмоль/л.

Далее все участники исследования были объединены с учетом имеющегося генотипа однонуклеотидного полиморфизма rs3134057 гена ОПГ. Группы сравнения были следующими: AA + AG против GG, а также AA против AG против GG. При анализе взаимосвязи между уровнем ОПГ в сыворотке крови и генотипом AA + AG по сравнению с GG не было выявлено статистически значительной разницы ($p > 0,05$). При сравнении групп с генотипами AA и AG, а также AA и GG также не получены достоверные результаты ($p > 0,05$). Результаты представлены на рисунках 7 (A, B, C, D) и 8 (A, B, C, D).

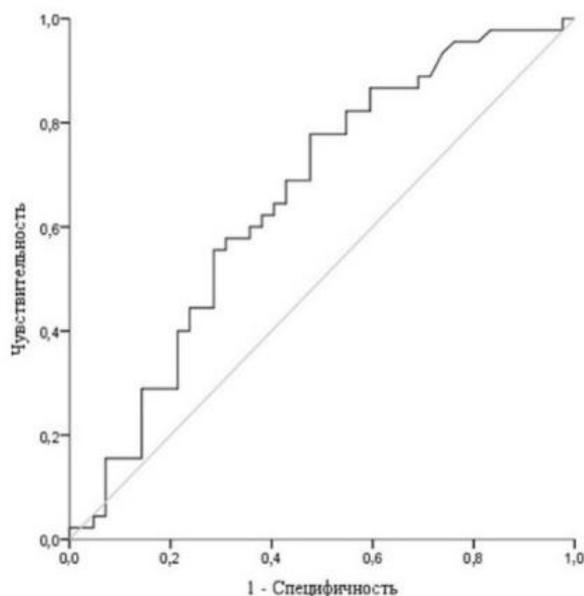


Рисунок 6. ROC-кривая для оценки уровня сывороточного ОПГ в группе наблюдения №1.

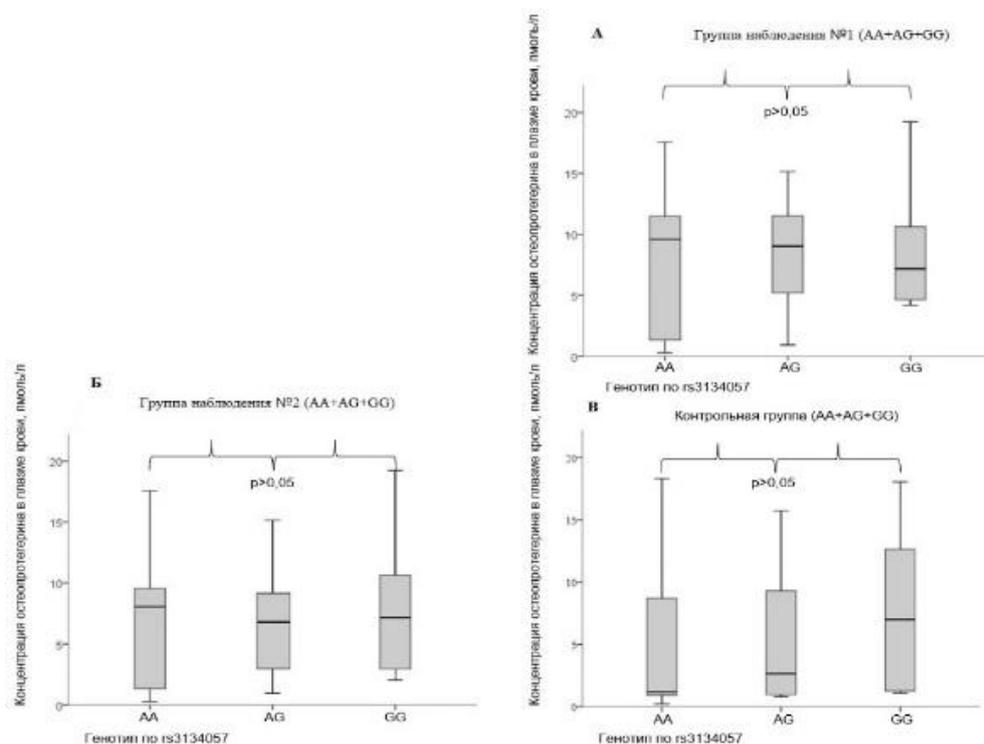


Рисунок 7. Зависимость уровня ОПГ от распределения по генотипу AA против AG против GG в группе наблюдения №1 (N=73)(А), в группе наблюдения №2 (N=28)(Б), в контрольной группе (N=51)(В).

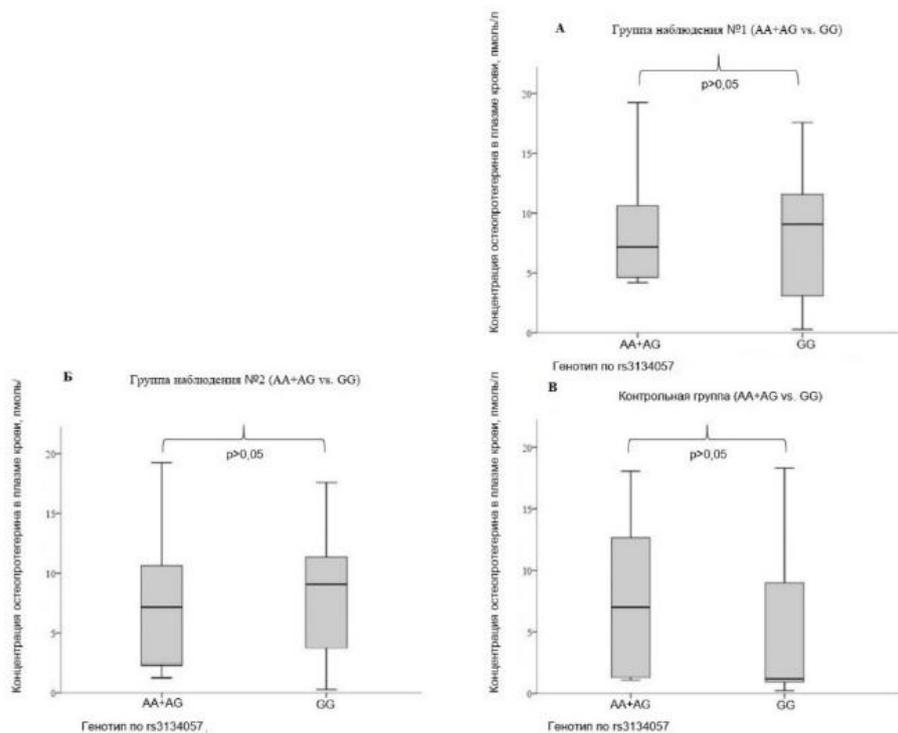


Рисунок 8. Зависимость уровня остеопротегерина от распределения по генотипу AA+AG против GG в группе наблюдения №1 (N=73)(А), в группе наблюдения №2 (N=28) (Б), в контрольной группе (N=51) (В).

Интегральная модель оценки течения рецидивирующего кальций-оксалатного уролитиаза и прогнозирования развития рецидива.

Для уточнения вероятности появления рецидива кальций-оксалатного уролитиаза, а также анализа течения заболевания, была построена интегральная модель, базирующейся на результатах осуществленного исследования. Многофакторная логистическая регрессия стала способом определения независимых факторов прогноза рецидива кальций-оксалатной формы уролитиаза. В качестве независимых переменных были предложены: индекс массы тела, наличие гипертонической болезни, уровень остеопротегерина сыворотки крови, уровень ионизированного кальция сыворотки крови и сумма двух генотипов *OPG* rs3134057 (AG+GG против AA). Выбор данных показателей для интегральной модели был сделан, т.к. в ходе проведенного исследования они показали возможную перспективность. А наличие и отсутствие рецидива кальций-оксалатного уролитиаза введена в модель в качестве двоичной зависимой переменной.

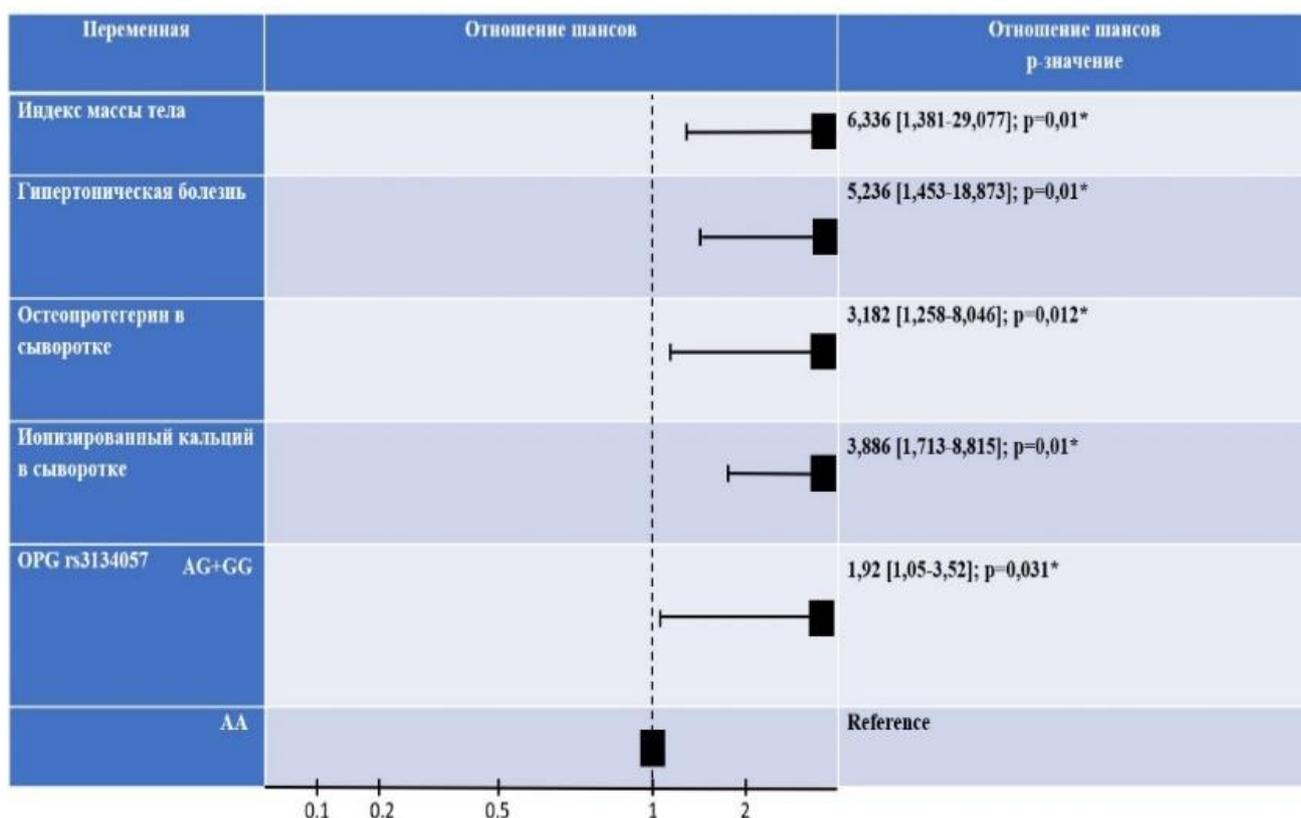


Рисунок 9. Модель многомерной логистической регрессии для факторов, связанных с развитием рецидива кальций-оксалатного уролитиаза.

В ходе формирования модели было определено пять показателей, которые являются независимыми предикторами рецидива кальций-оксалатной формы МКБ.

1. Индекс массы тела > 30 кг/м² - ОШ составило 6,336 (95%ДИ: 1,381-29,077; $p = 0,01$).
2. Гипертоническая болезнь - ОШ составило 5,236 (95% ДИ: 1,453-18,873; $p=0,01$).
3. Уровень ионизированного кальция в сыворотке крови - ОШ составило 3,886 (95%ДИ: 1,713-8,815; $p=0,01$).
4. Уровень остеопротегерина в сыворотке крови - ОШ составило 3,182 (95%ДИ: 1,258-8,046; $p = 0,012$).
5. Для суммы двух генотипов *OPG* rs3134057: гетерозиготного генотипа (AG) и гомозиготного мутантного генотипа (GG) против гомозиготного дикого генотипа (AA) отношение шансов составило 1,92 (95%ДИ: 1,05-3,52; $p = 0,031$).

Таким образом полиморфный вариант гена ОПГ (rs3134057), высокие уровни ОПГ, ионизированного кальция сыворотки крови, а также индекс массы тела и гипертоническая болезнь являются независимыми факторами развития рецидива кальций-оксалатной формы уролитиза (рисунок 9).

Обсуждение результатов генотипирования.

Изученные однонуклеотидные полиморфизмы располагаются в интронных участках, что означает их нахождение в зонах генома, где наблюдается высокая степень связи аллелей с генами, к которым они принадлежат. Таким образом для данных однонуклеотидных полиморфизмов характерна ассоциация с уровнем экспрессии соответствующих генов. В настоящее время нет данных *in vivo* и *in vitro* об изменениях в экспрессии гена TNFRS11B при обнаружении SNP rs3134057; однако было выявлено снижение минеральной плотности костной ткани в области дистального отдела лучевой кости, связанное с этим полиморфизмом [Feige U., 2001]. В нашем исследовании установлена ассоциация полиморфизма TNFRS11B с развитием рецидива МКБ.

Тогда как в работе Аполихина О. и коллег такая связь не была обнаружена [Аполихин О., 2016], что может объясняться различиями в критериях отбора: наш анализ охватывал только пациентов с кальций-оксалатной формой уролитиаза и разнообразными течениями болезни.

Из предшествующих исследований известно, что наличие полиморфизма в гене KL вызывает повышение его экспрессии [Bostrom M., 2010]. Повышенная экспрессия белка Клото усиливает выведение фосфора почками и снижает его абсорбцию в кишечнике, что может привести к гиперкальциурии. В нашем эксперименте была обнаружена значимая связь между однонуклеотидным полиморфизмом rs526906 в гене KL и риском рецидива уролитиаза [Константинова О., 2017; Аполихин О., 2017].

Обсуждение результатов определения сывороточного остеопротегерина.

Данное исследование подтвердило, что повышенный уровень ОПГ в сыворотке крови у пациентов с рецидивирующей формой мочекаменной болезни может свидетельствовать о развитии рецидива данного заболевания. В рамках нашего исследования не была обнаружена корреляция между уровнем остеопротегерина и генотипом по маркеру rs3134057. Это может быть связано с различными факторами, включая увеличение уровня ОПГ как ответ на воспалительный процесс, наличие окислительного стресса и возрастное снижение минеральной плотности костной ткани, что учитывается в представленных данных выборки. Тем не менее, имеются убедительные доказательства того, что однонуклеотидный полиморфизм в гене TNFRSF11B (rs3134057) является установленным фактором, способствующим снижению минеральной плотности костной ткани, что, в свою очередь, может быть связано с гиперкальциемией, увеличением концентрации солей в моче и высоким риском развития или рецидива уролитиаза, а также с повышением уровня ОПГ, выступающего в качестве медиатора снижения минеральной плотности костной ткани [Marangella D., 2011].

Данное исследование подтвердило, что повышенный уровень ОПГ в сыворотке крови у пациентов с рецидивирующей формой мочекаменной болезни может свидетельствовать о развитии рецидива данного заболевания. Проведение дополнительных исследований на более крупных выборках позволит окончательно определить значимость ОПГ в качестве маркера рецидива мочекаменной болезни, включая случаи с генетически детерминированными формами данного заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам работы были сформулированы следующие **выводы**:

1) У пациентов с кальций-оксалатным уролитиазом рецидивирующего течения выявлена ассоциация с наличием однонуклеотидного полиморфизма гена TNFRS11B (rs3134057), AG+GG vs. AA, ОШ (95% ДИ)=1,92 (1,05 – 3,52), $p=0,031$ и однонуклеотидного полиморфизма гена KL (rs526906), AA+AG vs. GG, ОШ (95% ДИ)=3,17 (1,26 – 7,96), $p=0,013$. Аллельные варианты генов TNFRS11B (rs3134057) и KL (rs526906) оказывают независимое влияние на риск развития рецидива кальций-оксалатного уролитиаза.

2) Независимыми предикторами развития рецидива кальций-оксалатного уролитиаза являются: наличие гетерозиготного (AG) и гомозиготного мутантного генотипов (GG) полиморфного варианта rs3134057 гена остеопротегерина, повышенные уровни остеопротегерина и ионизированного кальция сыворотки крови, индекс массы тела > 30 кг/м² и гипертоническая болезнь.

3) Носительство варианта гена TNFRS11B (rs3134057, сумма гетерозиготного и гомозиготного мутантного генотипов), ассоциированного с рецидивом кальций-оксалатного уролитиаза, не связано с концентрацией остеопротегерина в сыворотке крови.

4) При развитии рецидива кальций-оксалатного уролитиаза отмечается достоверное повышение уровня сывороточного остеопротегерина (+91,5%).

5) При концентрации сывороточного остеопротегерина выше 2,7 пмоль/л чувствительность и специфичность в отношении развития рецидива кальций-оксалатного уролитиаза составляет 78% и 52%, соответственно.

По результатам работы были предложены следующие **практические рекомендации:**

1) Для ранней диагностики рецидивирующего кальций-оксалатного уролитиаза рекомендуется проведения молекулярно-генетической диагностики для выявления однонуклеотидных полиморфизмов гена остеопротегерина (rs3134057) и гена Клоа (rs526906).

2) Для ранней диагностики рецидива кальций-оксалатного уролитиаза рекомендуется определение уровня сывороточного остеопротегерина.

3) При обнаружении у пациента с кальций-оксалатным уролитиазом гетерозиготного (AG) и гомозиготного мутантного генотипов (GG) полиморфного варианта rs3134057 гена остеопротегерина, повышенного уровня остеопротегерина сыворотки крови, повышенного уровня ионизированного кальция сыворотки крови, индекса массы тела > 30 кг/м², а также гипертонической болезни, необходимо проведение активного динамического наблюдения урологом по месту жительства в связи с высоким риском развития рецидива заболевания.

III. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Основные результаты, положения и выводы диссертации опубликованы в 4 научных работах автора общим объемом 4,28 п.л. (доля соискателя – 1,87 п.л.).

***Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра
Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index",
необходимые для защиты в диссертационном совете
МГУ имени М.В. Ломоносова:***

1. Кальций-чувствительный рецептор, α -клото и FGF21 в развитии нефролитиаза / И.И. Голодников, З.Ш. Павлова, А.А. Камалов, А.В. Савилов // Технологии живых систем. 2021. Т. 18. № 1. С. 32–40. (0,81 п.л. / авторский вклад – 0,2 п.л.) ИФ по РИНЦ – 0,132.

2. Наследственный фактор метафилактики мочекаменной болезни: современное состояние вопроса / А.С. Тивтикян, А.В. Савилов, Д.А. Охоботов, А.А. Тарасова, С.П. Шершнев, Л.М. Самоходская, А.А. Стригунов, Е.В. Афанасьевская, О.Ю. Нестерова, А.А. Камалов // Экспериментальная и клиническая урология. – 2022. – Т. 15, № 1. – С. 76–84. (1,04 п.л. / авторский вклад – 0,16 п.л.) ИФ по РИНЦ – 0,737.

3. Роль генетических факторов в развитии рецидивирующего уrolитиаза / А.В. Савилов, М. Джайн., Д.М. Анохин, М.Е. Коцепуга, А.С. Тивтикян, Л.М. Самоходская, Д.А. Охоботов, Е.В. Афанасьевская, В.Н. Мамедов, А.С. Шурыгина, С.П. Шершнев, А.А. Камалов // Вестник урологии. 2022. Т. 10. № 3. С. 54-64. (1,27 п.л. / авторский вклад – 0,64 п.л.) SJR – 0,168.

4. Изменения концентрации остеопротегерина в сыворотке крови при рецидивирующем уrolитиазе / А.В. Савилов, М. Джайн., Д.М. Анохин, М.Е. Коцепуга, А.С. Тивтикян, Л.М. Самоходская, Д.А. Охоботов, С.П. Шершнев, А.А. Камалов // Вестник урологии. 2023. Т. 11. № 3. С. 77-86. (1,16 п.л. / авторский вклад – 0,87 п.л.) SJR – 0,168.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ИМТ – индекс массы тела

КТ – компьютерная томография

МКБ – мочекаменная болезнь

МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова - Университетская клиника –

Медицинский научно-образовательный центр МГУ имени

М.В. Ломоносова

НИИ – научно-исследовательский институт

ОШ – отношение шансов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РАН – Российская Академия Наук

РФ – Российская Федерация

США – Соединенные Штаты Америки

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФКУ «ЦВКГ имени П.В. Мандрыка» Минобороны РФ – федеральное казенное учреждения «Центральный военный клинический госпиталь имени П.В. Мандрыка» Министерства обороны РФ

ЭКГ - электрокардиография

CASR - Calcium-sensing receptor

ESR1 - Estrogen receptor isoform 1

KL - Klotho protein

OPG – Osteoprotegerin