

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS

РАЗРАБОТКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОТИПА АЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛИЗМА КОФЕИНА

**Родионова Л.В.,
Животенко А.П.,
Самойлова Л.Г.,
Ларионов С.Н.**

Федеральное государственное научное учреждение «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Родионова Любовь Викторовна,
e-mail: greidmacho@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Многочисленность заболеваний и состояний, при которых ключевую роль имеет NAT2, диктует необходимость исследования как генотипа, так и фенотипа ацетилирования. Такие подходы позволяют определять группы риска, а также подбирать эффективные дозы лекарств, предотвращая развитие побочных эффектов и определяя оптимальную терапевтическую дозу.

Цель. Разработать экономичный и простой метод определения фенотипа ацетилирования на основе спектрофотометрического определения скорости метаболизма кофеина в качестве тестового препарата.

Методы. Работа проведена в группе из 52 пациентов со стенозами позвоночного канала (средний возраст $51,04 \pm 9,671$ лет) и 32 условно здоровыми людьми (средний возраст $53,32 \pm 0,933$ лет). В образцах крови и мочи до и после приема кофеина определяли креатинин и мочевую кислоту, а также измеряли оптическую плотность мочи на 272 нм. Для оценки скорости ацетилирования предложен расчет интегрального прогностического показателя. В качестве референсного метода использовали ПЦР со специфическими праймерами для выявления полиморфизмов NAT2, отражающихя на скорости ацетилирования.

Результаты. Разработан эффективный, легко выполнимый алгоритм, включающий технологию сбора, подготовки и анализа образцов крови и мочи до и после применения кофеина в качестве тестового препарата, расчет интегрального прогностического показателя для оценки скорости реакций ацетилирования. Метод пригоден для косвенной, более простой и мало затратной оценки скорости протекания реакций ацетилирования по сравнению с молекулярно-генетическими исследованиями.

Заключение. Определение фенотипа ацетилирования с помощью предлагаемых аналитических процедур позволяет выявить индивидуальные различия в метаболизме соединительной ткани, искать подходы к прогнозированию исходов лечения в зависимости от полиморфного варианта NAT2 с выделением групп риска. Полученные данные можно использовать для поиска новых звеньев патогенеза, реализации механизмов боли и фиброзирования.

Ключевые слова: ацетилтрансфераза NAT2, ацетилирование, прогнозирование, кофеин, мочевая кислота, креатинин

Статья поступила: 18.08.2025
Статья принята: 17.12.2025
Статья опубликована: 25.12.2025

Для цитирования: Родионова Л.В., Животенко А.П., Самойлова Л.Г., Ларионов С.Н. Разработка спектрофотометрического метода определения фенотипа ацетилирования на основе метаболизма кофеина. *Acta biomedica scientifica*. 2025; 10(6): 76-92. doi: 10.29413/ABS.2025-10.6.9

A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINING THE PHENOTYPE OF ACETYLATION BASED ON CAFFEINE METABOLISM

**Rodionova L.V.,
Zhivotenko A.P.,
Samoilova L.G.,
Larionov S.N.**

Irkutsk Scientific Center of Surgery
and Traumatology (Bortsov Revolyutsii str.
1, Irkutsk 664003, Russian Federation)

Corresponding author:
Lubov V. Rodionova,
e-mail: greidmacho@yandex.ru

RESUME

Justification. The multiplicity of diseases and conditions in which NAT2 plays a key role, dictates the need to study both the genotype and the phenotype of acetylation. Such approaches will make it possible to identify risk groups, as well as select effective doses of drugs, preventing the development of side effects and determining the optimal therapeutic dose.

The aim. To develop an economical and simple method for determining the phenotype of acetylation based on the spectrophotometric determination of the metabolic rate of caffeine as a test preparation.

Methods. The work was performed in a group of 52 patients with spinal canal stenosis (average age 51.04 ± 9.671 years) and 32 conditionally healthy people (average age 53.32 ± 0.933 years). Creatinine and uric acid were determined in blood and urine samples before and after taking caffeine, and the optical density of urine at 272 nm was measured. To estimate the acetylation rate, the calculation of an integral predictive indicator is proposed. PCR with specific primers was used as a reference method to detect NAT2 polymorphisms affecting the acetylation rate.

Results. An effective, easily executable algorithm has been developed that includes the technology of collecting, preparing and analyzing blood and urine samples before and after using caffeine as a test drug, and calculating an integral predictive indicator to assess the rate of acetylation reactions. The method is suitable for indirect, simpler and less costly assessment of the rate of acetylation reactions compared with molecular genetic studies.

Conclusion. The determination of the acetylation phenotype using the proposed analytical procedures makes it possible to identify individual differences in connective tissue metabolism, and to seek approaches to predicting treatment outcomes depending on the polymorphic variant of NAT2 with the identification of risk groups. The data obtained can be used to search for new links in pathogenesis, to implement the mechanisms of pain and fibrosis.

Keywords: acetyltransferase NAT2, acetylation, prediction, caffeine, uric acid, creatinine

Received: 18.08.2025

Accepted: 17.12.2025

Published: 25.12.2025

For citation: Rodionova L.V., Zhivotenko A.P., Samoilova L.G., Larionov S.N. A spectrophotometric method for determining the phenotype of acetylation based on caffeine metabolism. *Acta biomedica scientifica*. 2025; 10(6): 76-92. doi: 10.29413/ABS.2025-10.6.9

ВВЕДЕНИЕ

Для N-ацетилтрансферазы 2 (NAT2) известен генетический полиморфизм, в результате чего образуются быстрые и медленные ацетиляторы. Основной путь метаболизма субстратов этого фермента (гетероциклических аминов) включает N-гидроксилирование в печени с помощью CYP1A2, за которым во второй фазе следует O-ацетилирование с помощью NAT2 [1].

Снижение активности ацетилирования обычно происходит из-за уменьшения синтеза белка (в том числе и задействованных в этом процессе ферментов) [2], формирования ацетилтрансфераз с меньшей ферментативной активностью и/или стабильностью [3], а также из-за увеличения скорости деградации ацетилтрансфераз [4]. Наиболее частой причиной изменения активности NAT2 является полиморфизм этого гена, связанный с наличием одной или сочетания нескольких однонуклеотидных замен [3, 4].

Установлено, что от ацетиляторного статуса может зависеть как частота, так и различная степень риска развития различных заболеваний, в том числе онкологических [5, 6, 7], инсулинерезистентности, нарушению жирового обмена [8], диабета II типа [9], панкреатита [10], аллергии [11], системной красной волчанки [12], ревматоидного артрита, псориаза, болезни Паркинсона [13] и др.

Статус медленного ацетилирования NAT2 обычно связывают с повышенным риском возникновения побочных эффектов фармакотерапии, особенно гепатотоксичности. С другой стороны, у «быстрых» ацетиляторов более вероятны случаи неэффективности лечения из-за быстрого выведения препарата и развития в этой связи рецидива заболевания [14]. Ариламин-N-ацетилтрансферазы NAT1 и NAT2 в основном известны своим участием во второй фазе процесса детоксикации, но кроме этого, они экспрессируются во многих органах и тканях и могут выполнять другие физиологические функции. NAT, кроме гепатоцитов, обнаруживаются также и в лейкоцитах, фибробластах, мононуклеарах, уротелии, кишечнике, почках, эпителиальной выстилке бронхов легких, пародонтальных грануляциях, коже человека, простате и др. [15, 16].

Исследуется роль NAT2 в канцерогенезе и клеточном метаболизме. Каталитическая активность NAT2 оказывает существенное влияние на клеточную концентрацию кофактора ацетилкофермента A, что, в свою очередь, может влиять на множество клеточных процессов, поскольку кофермент A является универсальной молекулой, задействованной как в анаболических, так и в катаболических процессах и участвует в метаболизме огромного числа соединений, в том числе белков, липидов и углеводов. Последнее время также обсуждают ацетилирование в качестве возможного эпигенетического регулятора [17].

Особый интерес представляет участие NAT2 в метаболизме соединительной ткани. В 2016 году вышла работа V.J. Kresyun с соавторами по оценке риска образования спаек в брюшной полости в зависимости

от полиморфизма NAT2. Исследователи показали прогностическую ценность генетического полиморфизма гена NAT2 для определения риска возникновения послеоперационного спаечного процесса в брюшной полости у детей с фенотипическими признаками дисплазии соединительной ткани. По результатам этого исследования «быстрые» ацетиляторы отнесены к группе риска по развитию спаечной кишечной непроходимости, в связи с чем, признано целесообразным проводить для них комплексные профилактические мероприятия, начиная с интраоперационного этапа [18].

Дегенерация межпозвоночных дисков, одна из основных причин болей в пояснице, возникает из-за нарушения биосинтеза/обновления внеклеточного матрикса в диске. В лечении часто используют обезболивающий препарат Нейротропин™, который дополнительно оказывает анаболическое действие на синтез гликозаминогликанов в клетках пульпозного ядра. Показано, что влияние нейротропина на уровень агрегана коррелировало с активностью NAT2 [19]. Более подробно о роли NAT2 в метаболизме соединительной ткани написано в нашей работе [20].

Статус медленного ацетилирования NAT2 обычно связывают с повышенным риском возникновения побочных эффектов фармакотерапии, особенно гепатотоксичности [14]. С другой стороны, у «быстрых» ацетиляторов более вероятны случаи неэффективности лечения из-за быстрого выведения препарата и развития в этой связи рецидива заболевания [14]. Несмотря на важность, научный и практический интерес оценки типа ацетилирования и выяснения его роли в метаболизме различных тканей, особый интерес представляет исследование влияния полиморфизма NAT2 на развитие и течение дегенеративно-дистрофических заболеваний позвоночника, именно в этом направлении мало исследований и очень многое еще только предстоит выяснить.

Прогнозировать скорость реакций ацетилирования можно с помощью молекулярно-генетических методов, определив совокупность наиболее часто встречающихся SNP в структурной области гена NAT2 [21], которые могут отражать полиморфность клинических вариантов патологии. Это может дать ценную информацию для прогнозирования реакций соединительной ткани на оперативное вмешательство, для определения подходов к комплексной профилактике развития фиброза, а также поиска путей оптимизации терапии с учетом метаболического статуса. Однако молекулярно-генетические методы требуют достаточно много времени, оборудованной ПЦР лаборатории, обученного персонала и достаточного количества средств на дорогостоящие реагенты и расходные материалы.

Определение скорости N-ацетилирования часто используют как фенотипический маркер, позволяющий избежать развития осложнений фармакотерапии у медленных ацетиляторов и наоборот, увеличить дозу для быстрых ацетиляторов для достижения эффективной концентрации препарата при его более быстром выведении из организма [22].

Предлагались методы с использованием изониазида, сульфадимезина, а также дозированной по массе тела нагрузке пищевыми напитками (кофе, чай). По методу Буловской Л.Н. в НИИ детских инфекций (г. Санкт-Петербург) определяли разницу клиренса мочевой кислоты до и после нагрузки, за пограничное значение разницы клиренса мочевой кислоты после и до приёма кофеина принимали величину 4,48 мл/мин — минимальное значение показателя для быстрых ацетилияторов [23].

Наиболее точным методом оценки фенотипа *NAT2* является оценка соотношений метаболитов кофеина в моче с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии или масс-спектрометрии. Однако эти методы довольно дороги, трудоемки и требуют специально обученного персонала [24].

ЦЕЛЬ

Разработать экономичный и простой метод определения фенотипа ацетилирования на основе спектрофотометрического определения скорости метabolизма кофеина в качестве тестового препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выполнено когортное одноцентровое исследование на основании данных 52 пациентов со стенозами позвоночного канала и дурального мешка в возрасте от 27 до 66 лет, в среднем $51,04 \pm 9,671$ лет. Для участия в исследовании методом сплошной выборки отбирали пациентов со стенозами позвоночного канала старше 18 лет, поступавших в нейрохирургическое отделение ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» на оперативное лечение с 2021 по 2023 год. Блок-схема определения участников исследования приведена на рисунке 1. В качестве критериев включения использовали верифицированные с помощью МРТ и МСКТ показатели утолщения *Ligamentum flavum* $\geq 3,5$ мм, а также сужение позвоночного канала менее 10 мм в диаметре и проведенное оперативное лечение с целью декомпрессии и реконструкции позвоночного канала с установкой системы транспедикулярной фиксации. Из исследования исключали пациентов с инфекционными гнойными заболеваниями M46.2, M46.3, M46.5, M46.9 по МКБ-10, пациентов с сахарным диабетом 1 и 2 типа (E10 и E11 по МКБ-10), с системной красной волчанкой (M32 по МКБ-10), с ревматоидным артритом (M05-M06 по МКБ-10) в том случае, если пациенты принимали глюкокортикоидные препараты во время проведения исследования, с псориазом (L40 по МКБ-10), подагрой (M10 по МКБ-10), если эти пациенты принимали аллопуринол и бронхиальной астмой (J45 по МКБ-10) в случае использования ингаляционных кортикостероидных препаратов. На этой группе пациентов была разработана технология по определению фенотипа ацетилирования.

Для независимой валидации теста использовали показатели 32 человек, условно здоровых лиц, не предъявляющих жалоб на состояние здоровья, без явной патологии опорно-двигательного аппарата, жителей г. Иркутска, сопоставимых по возрасту с «опытной» группой ($51,52 \pm 0,933$ лет).

В качестве критериев включения в контрольную группу использовали отсутствие жалоб на состояние здоровья в течение как минимум 3 предыдущих месяцев, отсутствие явной патологии опорно-двигательного аппарата (со слов), критерии исключения совпадали с таковыми выше описанной группы пациентов со стенозами.

В качестве тестового препарата выбран кофеин из-за его безопасности по сравнению с другими препаратами, используемыми в качестве «зондов» для исследования *in vivo* [25]. Все пациенты, принимавшие участие в исследовании, подписали добровольное информированное согласие, им был подробно объяснен порядок действий по обеспечению качественного сбора биологических жидкостей. Для стандартизации поступления кофеина в организм за сутки до исследования и весь период исследования испытуемые соблюдали диету с исключением чая, кофе, шоколада, бананов, какао, и др. кофеинсодержащих напитков и продуктов. После безкофеиновой диеты производили забор крови и мочи. Кровь забирали в асептических условиях в соответствии с общими правилами из локтевой вены в пробирку с активатором образования сгустка, не допуская при этом энергичного встряхивания пробирки и вспенивания ее содержимого.

Мочу собирали с 18 часов вечера до 10 часов утра следующего дня. Собирали весь объем мочи за заданный промежуток времени, хранили ее при $6-8^{\circ}\text{C}$ до момента доставки в лабораторию. Объем собранной мочи измеряли с помощью аттестованных поверенных мерных цилиндров с точностью до 1 мл. На следующий день проводили консультацию терапевта, измерение артериального давления и определяли дозу кофеина из расчета 4 мг на килограмм массы тела. После приема кофеина в качестве тестового препарата в 18 часов повторно осуществляли забор биологических жидкостей: крови (на следующее утро) и мочи (с момента приема разовой дозы кофеина в 18 час. и до 10 час. следующего дня). Все биологические образцы исследовали по одной схеме: в сыворотке крови определяли концентрацию креатинина и мочевой кислоты, а в моче после определения ее точного объема измеряли оптическую плотность (ОП) при 272 нм и также измеряли концентрацию креатинина и мочевой кислоты. На основе полученных данных производили расчеты.

Спектрофотометрия мочи. Аликвоту мочи центрифугировали в течение 15 минут при 1,5 тыс. об/мин., отбирали прозрачный супернатант, после чего измеряли его оптическую плотность на длине волны 272 нм (соответствует максимуму поглощения кофеина и его метаболитов) на спектрофотометре «СФ-2000» (Россия).

Биохимические исследования крови и мочи. В собранных (1 – после безкофеиновой диеты,

до применения кофеина и 2 – после употребления рассчитанной дозы кофеина) образцах крови и мочи определяли на биохимическом автоматическом анализаторе Sapphyre 400 (Япония) концентрацию креатинина и мочевой кислоты. Для биохимического

анализа мочи ее разводили в 10 (для определения концентрации мочевой кислоты) и в 100 раз (для измерения концентрации креатинина) с целью проведения измерений в линейном диапазоне. Для определения концентрации креатинина и мочевой кислоты

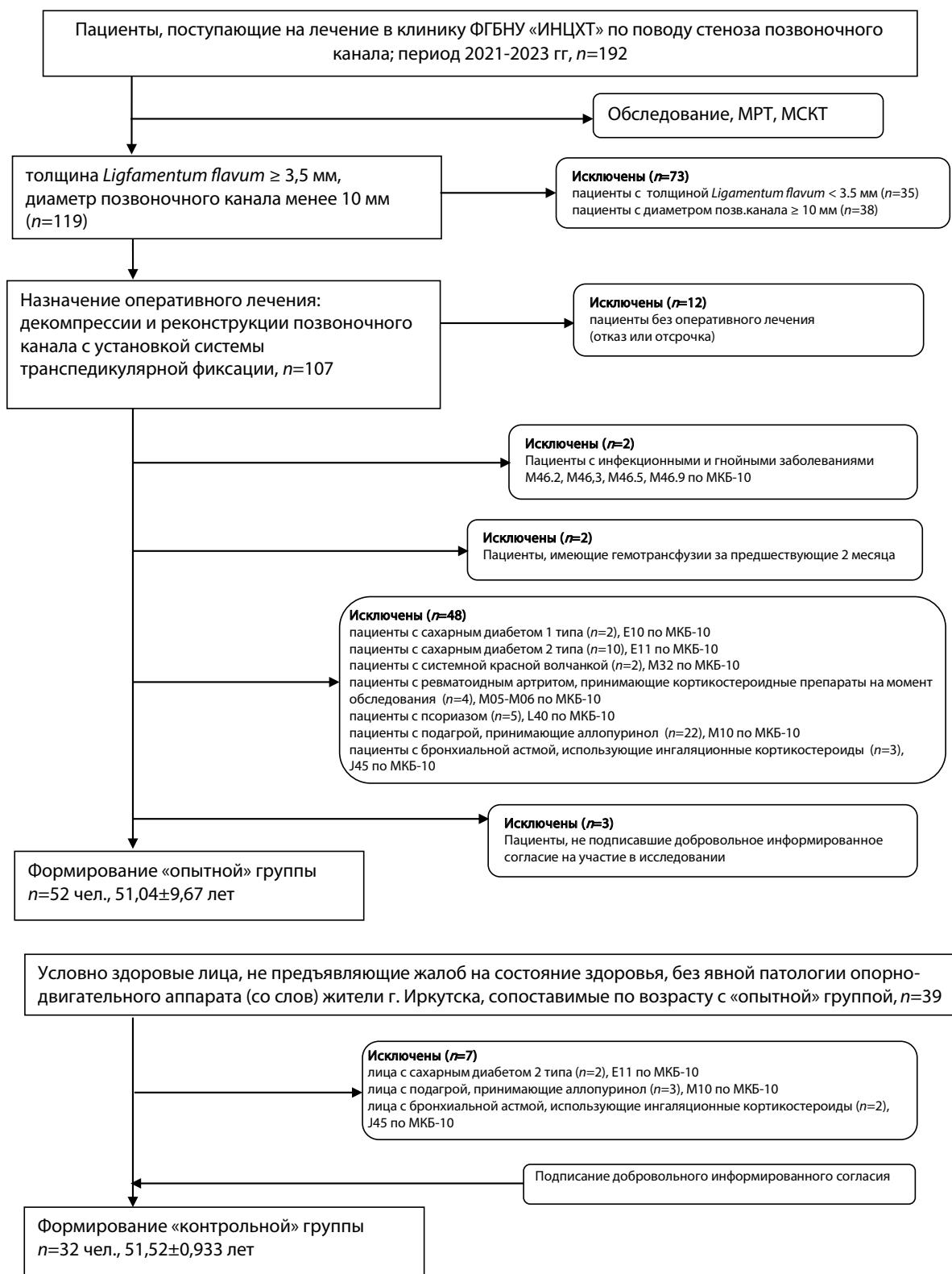


РИС. 1.
Блок-схема определения участников исследования

FIG. 1.
Block scheme of study participant selection

использовали коммерческие тест-системы для клинической лабораторной диагностики производства Vital (Санкт-Петербург, Россия). Контроль качества проводимых исследований выполняли в соответствии с действующими нормативными документами МЗ РФ.

Коэффициент вариации (CV) определения биохимических параметров, рассчитывали по формуле $CV = (\sigma / \mu) \times 100\%$, где σ – стандартное отклонение выборки; μ – среднее арифметическое выборки составлял для каждого из определяемых параметров не более 5,7 %.

Правильность определения биохимических анализов проверяли с помощью двух уровней коммерческих контрольных сывороток в соответствии с действующей нормативно-правовой документацией для клинико-диагностических лабораторий.

Расчет интегрального прогностического показателя. Фенотип ацетилирования устанавливали на основе расчета интегрального прогностического показателя с использованием данных определения мочевой кислоты до и после приема кофеина в качестве тестового препарата, поправку на функциональное состояние почек делали по клиренсу креатинина. Дополнительно учитывали спектрофотометрическое измерение при $\lambda = 272$ нм.

Расчет клиренса мочевой кислоты и креатинина производили по формуле:

Клиренс вещества =

$$\frac{\text{концентрация вещества в моче}}{\text{концентрация вещества в крови}} \times \text{минутный диурез}$$

Для регулирования вклада в прогнозирование каждого показателя, согласно его значимости для исследования нами предложен интегральный прогностический показатель (ИПП), рассчитываемый по формуле:

$$ИПП = \left[\frac{Cl - UA}{Cl - Kr} \times ОП_{272} \times 100 + a + b \right] / ППТ$$

где $Cl-UA$ – клиренс мочевой кислоты после приема кофеина, $Cl-Kr$ – клиренс креатинина после приема кофеина, a – дополнительный балл, который равен 1 в случае, если произошло увеличение концентрации мочевой кислоты по сравнению с исходным уровнем, в противном случае, $a=0$; b – дополнительный балл, который равен 1 в случае, если произошло увеличение оптической плотности мочи при $\lambda = 272$ нм, по сравнению с исходным уровнем, в противном случае $b=0$. ППТ – площадь поверхности тела, рассчитанная по формуле Мостеллера:

$$ППТ = \sqrt{\frac{\text{рост, см} \times \text{вес, кг}}{3600}}$$

На качество полученных результатов может повлиять температурный режим доставки биологического материала в лабораторию, поэтому нужно строго следить за соблюдением температурного режима. Также критически важно собирать полный объем выделенной мочи за заданный промежуток времени, поскольку потеря даже небольшой части мочи может существенно отразиться на результатах и стать источником ошибок.

Определение полиморфизмов гена NAT2 (реперентный метод определения скорости ацетилирования). Для исследования однонуклеотидных полиморфизмов структурной области гена NAT2 использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Кровь забирали из локтевой вены. Геномную ДНК выделяли из ядерных клеток крови набором реагентов «Номотек-Экстракт ДНК-2» (ООО «Номотек», Ref R1003, Россия) с использованием лизиса с последующей очисткой ДНК на микроцентрифужных колонках.

Для контроля контаминации во время каждого выделения ДНК использовали отрицательный контроль выделения. Полученный препарат геномной ДНК использовали для выявления SNP NAT2 с помощью специфической ПЦР с использованием набора реагентов «ГенТест-М NAT2» (ООО «Номотек», кат. R2006, Россия). Определяли следующие наиболее часто встречающиеся полиморфизмы гена NAT2: C282T (rs1041983), T341C (rs1801280), C481T (rs1799929), G590A (rs1799930), A803G (rs1208) и G857A (rs1799931).

В каждой постановке использовали отрицательные контроли выделения, а также для контроля прохождения ПЦР и верного определения генотипов ставили положительные контрольные образцы («дикая» гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота), содержащие смесь синтетических матриц ДНК, содержащих последовательности генотипов искомых полиморфизмов.

Выделенную ДНК до момента постановки ПЦР сохраняли при температуре от -28 до -20°C.

Для полученных при выделении ДНК отрицательных контрольных образцов, прошедших все стадии процедуры также проводили специфическую ПЦР для выявления возможных дефектов выделения.

Условия проведения амплификации были определены инструкцией производителя тест-систем. Измерение флуоресценции проводили по каналу FAM.

Параметр «Пороговый уровень» (Threshold) для программируемого амплификатора CFX96 (Bio Rad, USA), используемого для измерений, вводили в значении 50. Анализ считали легитимным, если в исследуемом образце содержание ДНК было более 1 нг/мкл ($Cq \leq 30$) и соблюдались все параметры, указанные в рекомендациях производителя набора реагентов.

Аналитические характеристики метода определяли в обеих исследуемых группах. Чувствительность (Se) определяли по формуле: $Se = TP/(TP+FN) \times 100$, где TP – True Positives или в данном случае правильно

диагностированные «быстрые» ацетиляторы, FN – False Negatives – ложно отрицательные, то есть «быстрые» ацетиляторы, неправильно определенные как «медленные». Специфичность (Sp) рассчитывали по формуле: $TN/(TN+FP) \times 100$, где TN – True Negatives – «медленные» ацетиляторы, правильно классифицированные с помощью разработанного метода, FP – False Positives или «медленные» ацетиляторы ошибочно отнесенные к классу «быстрые».

Этическая экспертиза. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», протокол № 9 от 16.12.2021; все пациенты добровольно подписали информированное согласие для участия в исследовании.

Статистический анализ. Для проведения расчетов, построения графиков, а также анализа ROC-кривых использовали MS Excel 2022, Statistica v.10 и MedCalc v 23.4.0. Различия считали значимыми в случае достижения $p < 0,05$.

Для оценки размера эффекта использовали формулу Коэна для несвязанных выборок:

$d = (M_1 - M_2)/s_p$, где M_1 и M_2 – средние значения групп «быстрых» и «медленных» ацетиляторов, соответственно; s_p – объединенное стандартное отклонение. Объединенное стандартное отклонение вычисляли по формуле:

$$\sigma_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Значение объединенного стандартного отклонения для группы больных получилось

$$\begin{aligned} \sqrt{\frac{(30-1) \times 3,44^2 + (22-1) \times 1,94^2}{30+22-2}} &= \sqrt{\frac{29 \times 11,8336 + 21 \times 3,7636}{50}} \approx \\ &= \sqrt{\frac{343,1744 + 79,0356}{50}} \approx \sqrt{8,4442} \approx 2,906. \end{aligned}$$

Размер эффекта (d) был также рассчитан с использованием программы MedCalc:

$$d = \frac{8,19 - 4,95}{2,906} \approx \frac{3,24}{2,906} \approx 1,115$$

С применением этих данных, зная размер эффекта, количество испытуемых и выбрав уровень значимости как $\alpha = 0,05$, с помощью программы MedCalc рассчитывали оценку мощности.

Определение оптимальной точки отсечения (cut off value) на ROC-кривой проводили с помощью критерия Йюдена, рассчитанного для каждой подходящей точки в верхнем левом углу ROC-кривой в программе MedCalc по формуле $J = Se + Sp - 1$. Далее выбирали точку с максимальным значением индекса Йюдена и определяли ее координаты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристики исследуемых групп представлены в таблице 1. Исходно среди поступивших за срок выполнения исследования 192 пациентов со стенозами позвоночного канала по описанным выше критериям (см. Материалы и методы) было отобрано 52 человека.

Среди первоначально выбранных, условно здоровых 39 лиц контрольной группы, было исключено всего 7 человек после первичного собеседования и анкетирования по причине выявления сопутствующих заболеваний и принимаемых в связи с этим препаратов, которые могли бы повлиять на биохимические анализы. Группы сопоставимы по основным характеристикам. Все отобранные для исследования пациенты были обследованы по полной схеме и на последующих этапах никто не выбыл. Исследования были проведены в полном объеме, поэтому отсутствующих данных не было.

Результаты оценки воспроизводимости определения мочевой кислоты и креатинина определяли при десятикратном исследовании контрольного материала как внутри-, так и между аналитическими сериями, данные приведены в таблице 2.

Коэффициент вариации (CV) находился в диапазоне от 0,84–0,71 % до 5,2–7,3 % для мочевой кислоты и от 3,8–4,2 % до 4,1–5,2 % для креатинина внутри- и между сериями определений, соответственно, что доказывает достаточную аналитическую надежность определения биохимических показателей.

Полученные значения для опытной и контрольной групп до и после приема кофеина приведены в таблицах 3–6. Между «быстрыми» и «медленными» ацетиляторами значимые отличия в обеих группах были выявлены только для оптической плотности мочи, измеренной на 272 нм и для ИПП. С помощью разработки интегрального прогностического показателя мы стремились получить совокупную оценку изменения клиренса мочевой кислоты с поправкой на выведение креатинина и ОП мочи на 272 нм. Таким образом, в совокупности эти показатели могли дать удобный способ расчета для прогнозирования скорости реакций ацетилирования.

При размере эффекта $d \approx 1,115$, количестве участников $n_1=30$ («быстрые» ацетиляторы) и $n_2=22$ («медленные» ацетиляторы), статистическая мощность составила 0,95. То есть, вероятность возможного выявления эффекта (различия ИПП между группами) близка к 95 %.

ROC-кривая (рис. 2) показывает зависимость количества верно классифицированных положительных («быстрое» ацетилирование) примеров от количества неверно классифицированных отрицательных случаев («медленное» ацетилирование) в группе пациентов со стенозами позвоночного канала. Референтным методом выбрали ПЦР исследование на полиморфизмы NAT2. Площадь под ROC-кривой составила 0,870, $p < 0,001$.

При подборе метода расчета ИПП мы сравнивали разные способы его вычисления (без учета и с учетом площади поверхности тела) (рис. 3).

ТАБЛИЦА 1
**ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП БОЛЬНЫХ,
 СФОРМИРОВАННЫХ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ**

TABLE 1
**CHARACTERISTICS OF THE PATIENT GROUPS
 FORMED FOR THE STUDY**

Характеристики	Пациенты со стенозами позвоночного канала, n=52	Лица, не предъявляющие жалоб на состояние здоровья, жители г. Иркутска (контроль), n=32
Возраст, лет	51,04±9,671	53,32±0,933
Мужчин, n (%)	29 (55,8)	14 (43,8)
Женщин, n (%)	23 (44,2)	18 (56,3)
Европеоиды, n (%)	52 (100)	32 (100)
Быстрых ацетилияторов, n (%)	30 (57,7)	19 (59,4)
Медленных ацетилияторов, n (%)	22 (42,3)	13 (40,6)
ГБ 0 ст., n (%)	24 (46,15)	16 (50,0)
Сопутствующая патология (вне обострения)		
ГБ 1 ст., n (%)	5 (9,62)	5 (15,6)
ГБ 2 ст., n (%)	19 (33,54)	6 (18,8)
ГБ 3 ст., n (%)	4 (7,69)	3 (9,4)
Калькулезный холецистит, n (%)	4 (7,69)	2 (6,3)
Бронхиальная астма (ремиссия), n (%)	1 (1,92)	0 (0)
Ревматоидный артрит (ремиссия), n (%)	1 (1,92)	0 (0)
Подагра (ремиссия), n (%)	1 (1,92)	0 (0)
Аллергия в анамнезе, n (%)	1 (1,92)	2 (6,3)

Примечания: *данные возраста представлены как ср.арифм. ± ошибка сред.арифм.

Ограничения: в группе контроля данные о сопутствующей патологии собирали со слов обследуемых лиц

ТАБЛИЦА 2
**ПОКАЗАТЕЛИ АНАЛИТИЧЕСКОЙ НАДЕЖНОСТИ
 ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ
 И КРЕАТИНИНА**

TABLE 2
INDICATORS OF ANALYTICAL RELIABILITY OF URIC ACID AND CREATININE DETERMINATION

Аналит	Показатель аналитической надежности	Внутри серии				Между сериями	
		среднее	211,3	215,4	214,8	218,4	219,9
Мочевая кислота	SD	6,8	4,9	7,2	7,3	6,8	5,2
	CV	0,84	0,52	0,71	0,86	1,1	1,14
	среднее	98,3	102,8	99,7	102,3	99,5	108,3
Креатинин	SD	3,2	2,8	4,1	4,3	5,1	5,7
	CV	3,8	2,3	4,2	4,1	4,8	5,2

Примечания: SD – стандартное отклонение, CV – коэффициент вариации.

ROC-кривая, построенная для ИПП, рассчитанного с учетом поверхности площади тела немного дальше заходит на верхний левый угол, что подтверждается большей AUC. Площади, ограниченные ROC-кривыми для двух методов расчета (с учетом и без учета площади поверхности тела) составили 0,870 и 0,883, соответственно. Поскольку AUC для расчета ИПП с учетом площади поверхности тела была больше, мы выбрали данный способ подсчета как наиболее оптимальный.

В таблицах 7–8 приведено фактическое состояние типа ацетилирования участников исследования с оценкой правильности классификации с помощью предлагаемого метода.

В группе пациентов со стенозами позвоночного канала чувствительность разрабатываемого метода составила $Se = 93,3\%$, специфичность $Sp = 90,91\%$.

В контрольной группе 2 человека с «быстрым» типом ацетилирования неверно были классифицированы с помощью предлагаемой технологии

как «медленные» и 1 человек с «медленный» ацетилятор определился как «быстрый» (табл. 6). Это может быть связано как с неучтенными ошибками преаналитического этапа, так и расхождением между генотипом и фенотипом или не доведенной до оптимальной чувствительностью метода.

Наименьшая чувствительность наблюдалась в контрольной группе $Se = 89,47\%$, возможно из-за ее меньшей численности, но все же обеих группах чувствительность и специфичность были достаточно приемлемы.

Статус ацетилирования был подтвержден с помощью референтного метода определения шести наиболее распространенных полиморфизмов [rs1041983, rs1801280, rs1799929, rs1799930, rs1208, rs1799931]. Различные комбинаторные сочетания выбранных полиморфизмов позволили выявить большинство «медленных» аллелей и часть «быстрых». Совпадение генотипа и фенотипа составляло от 89,47 до 93,3 % (табл. 6–7), что доказывает эффективность предлагаемого метода. В результате применения данной технологии получена достаточная чувствительность и специфичность определения фенотипа ацетилирования.

В качестве порога или «точки отсечения» (cut-off value) для наиболее адекватного разделения быстрых и медленных ацетиляторов с помощью критерия Йодена в программе MedCalc рассчитали значение 6,8, как ближе всего расположенное к верхнему левому углу при построении ROC-кривой и максимально удаленное от диагонали. Считается, что именно эта точка отсечки наиболее целесообразна для бинарной классификации и соответствует наилучшему компромиссу между чувствительностью и специфичностью.

При оценке расчетных значений ИПП все пациенты, имеющие ИПП ниже значения 6,8, классифицировались как «медленные» ацетиляторы и, соответственно, пациентов, имеющих ИПП больше 6,8 – относили к «быстрым» ацетиляторам.

Таким образом, если при выполнении описываемой технологии ИПП больше или равен 6,8, то фенотип ацетилирования считают быстрым, если меньше – то медленным.

Определение фенотипа ацетилирования по описанной нами методике при применении кофеина в качестве тестового препарата позволяет по анализу крови и мочи прогнозировать скорость реакций ацетилирования, которые так важны для жизнедеятельности соединительной ткани, в том числе и структур позвоночно-двигательного сегмента, а также принимают активное участие в реализации ключевых адаптационных механизмов. Таким образом, прогнозирование скорости реакций ацетилирования с использованием спектрометрического метода определения фенотипа ацетилирования по метаболизму кофеина является эффективным и легко выполнимым, а также обеспечивает получение новой информации для научных исследований. С применением предлагаемого способа возможно более быстро и дешевое выявление особенностей реакций ацетилирования по анализу образцов крови и мочи.

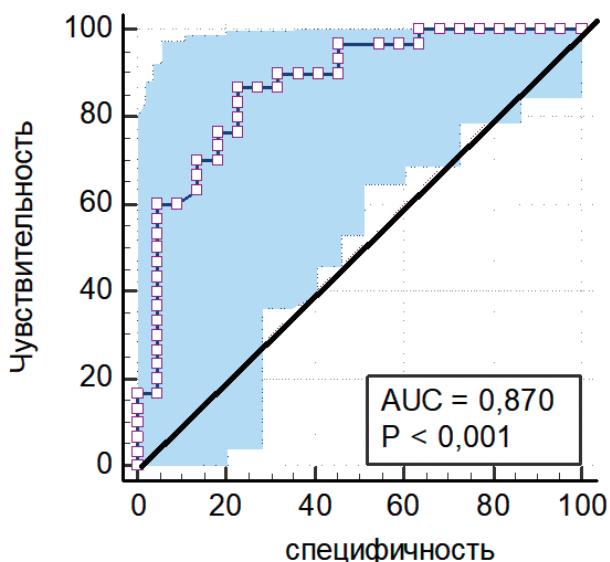


РИС. 2.

ROC-кривая, построенная по данным классификации на «быстрых» и «медленных» ацетиляторов «опытной» группы с помощью предлагаемого метода с расчетом ИПП и с использованием real time ПЦР в качестве референтной методики

FIG. 2.

ROC curve constructed based on the classification data for “fast” and “slow” acetylators of the “experimental” group using the proposed method with calculation of the integral predicative indicator and using real-time PCR as a reference method

ИПП-2

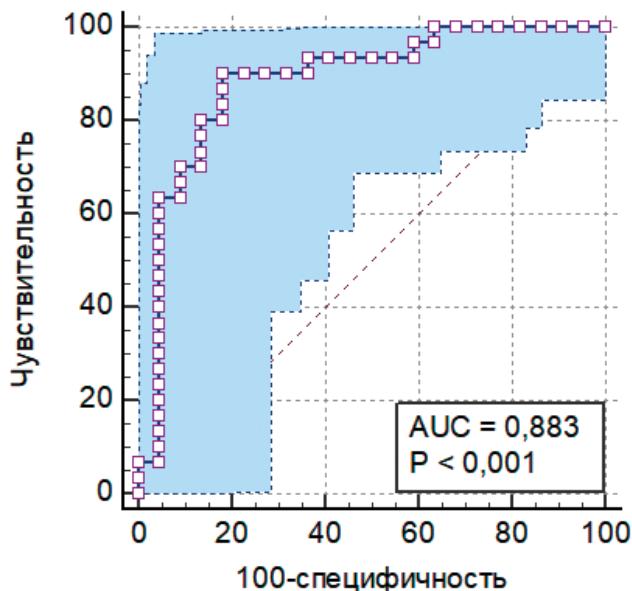


РИС. 3.

ROC-кривая, построенная по данным классификации на «быстрых» и «медленных» ацетиляторов «опытной» группы с помощью расчета ИПП с учетом поверхности тела (референтный метод – real time ПЦР)

FIG. 3.

ROC curve constructed based on the classification data for “fast” and “slow” acetylators of the “experimental” group using the calculation of the integral predicative indicator taking into account the body surface area (reference method – real-time PCR)

ТАБЛИЦА 3
**ПОКАЗАТЕЛИ «ОПЫТНОЙ» ГРУППЫ ДО УПОТРЕБЛЕНИЯ КОФЕИНА
 В КАЧЕСТВЕ ТЕСТОВОГО ПРЕПАРАТА, $n=52$**

TABLE 3
**INDICATORS OF THE "EXPERIMENTAL" GROUP BEFORE USING CAFFEINE AS
 A TEST DRUG, $n=52$**

До приема кофеина	МД	ИА мочи	ИА сыворотки крови	Креатинин мочи	Креатинин сыворотки крови	ОП-272	Клиренс кр-на	Клиренс кр-на	Выведение моч.к-ты за сутки	Выведение кр-на за сутки	Площадь поверхности тела (ППТ)
<i>Референтные значения</i>											
0,5–1,5 мл/мин	1,48–4,43 ммоль/ сутки	210–420, 150–350 мкмоль/л	Муж.– 7,1–17, ммоль/л, жен.– 5,6–15,8 ммоль/л	Муж.– 72–115, ммоль/л, жен.– 58–96 мкмоль/л	–	–	5,4–9 мл/мин	64–126 мл/мин	1,48–4,43 мМ/сутки	8,84–13,3 мМ/сутки	формула Мостелера= корень((рост, см × вес, кг)/3600))
Среднее знач.	1,067	2223,18	304,73	8154,95	88,74	0,1322	7,947	96,91	3,41	12,31	1,988
СО	0,151	376,67	50,21	1159,11	8,62	0,0346	1,956	9,96	0,74	0,73	0,213
СОС	0,028	68,77	9,17	211,62	1,57	0,0063	0,357	1,82	0,14	0,13	0,039
<i>«быстрые» (определенные с помощью ПЦР), $n=30$</i>											
Среднее знач.	1,01	2116,89	286,49	8954,81	86,16	0,08	7,54	103,69	3,07	12,73	1,985
СО	0,19	416,68	35,39	1433,73	10,95	0,03	2,10	10,78	0,81	0,79	0,215
СОС	0,04	88,84	7,55	305,67	2,34	0,01	0,45	2,30	0,17	0,17	0,046
<i>«медленные» (определенные с помощью ПЦР), $n=22$</i>											
Среднее знач.	1,01	2116,89	286,49	8954,81	86,16	0,08	7,54	103,69	3,07	12,73	1,985
СО	0,19	416,68	35,39	1433,73	10,95	0,03	2,10	10,78	0,81	0,79	0,215
СОС	0,04	88,84	7,55	305,67	2,34	0,01	0,45	2,30	0,17	0,17	0,046
Различия между «быстрыми» и «медленными», $p<0,05$											

ТАБЛИЦА 4
**ПОКАЗАТЕЛИ ОПЫТНОЙ ГРУППЫ ПОСЛЕ УПОТРЕБЛЕНИЯ КОФЕИНА
 В КАЧЕСТВЕ ТЕСТОВОГО ПРЕПАРАТА, $n = 52$**

TABLE 4
**INDICATORS OF THE EXPERIMENTAL GROUP AFTER CONSUMING CAFFINE
 AS A TEST DRUG, $n = 52$**

После приема кофеина	МД	UA мочи	UA сыворотки крови	Креатинин мочи	Креатинин сыворотки крови	ОП-272	Клиренс UA	Клиренс кр-на	Выведение моч.к-ты за сутки	Выведение кр-на за сутки	ИПП с коррекцией площадь тела
Референтные значения											
Референтные значения	0,5–1,5 мл/мин	1,48–4,43 ммоль/сутки	Муж.– 210–420, жен.– 150–350 мкмоль/л	Муж.– 7,1–17 ммоль/л, жен.– 5,6–15,8 мкмоль/л	Муж.– 72–115, жен.– 58–96 мкмоль/л	—	—	5,4–9 мл/мин	64–126 лл/мин	1,48–4,43 мМ/сутки	8,84–13,3 мМ/сутки
Среднее знач.	1,115	2269,253	312,990	8201,443	86,587	0,190	8,181	104,584	3,615	12,954	8,19
СО	0,163	355,424	47,420	1117,335	8,207	0,142	1,765	10,835	0,627	1,044	3,44
СОС	0,030	64,891	8,658	203,996	1,498	0,026	0,322	1,978	0,115	0,191	0,63
«быстрые» (определенные с помощью ПЦР), $n = 30$											
Среднее знач.	1,045	2187,800	300,145	8975,868	86,041	0,107	7,661	107,284	3,273	13,161	4,95
СО	0,194	422,009	36,792	1434,741	10,668	0,037	2,038	11,008	0,839	0,867	1,94
СОС	0,041	89,973	7,844	305,888	2,274	0,008	0,434	2,347	0,179	0,185	0,41
Различия между «быстрыми» и «медленными», $p < 0,05$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	$p < 0,05$

ТАБЛИЦА 5
**ПОКАЗАТЕЛИ КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ ДО УПОТРЕБЛЕНИЯ КОФЕИНА
 В КАЧЕСТВЕ ТЕСТОВОГО ПРЕПАРАТА, $n=32$**

TABLE 5
**INDICATORS OF THE CONTROL GROUP BEFORE USING CAFFEINE AS A TEST
 DRUG, $n=32$**

До приема кофеина	МД	UA мочи	UA сыворотки крови	Креатинин мочи	Креатинин сыворотки крови	ОП-272 мочи	Клиренс UA	Клиренс кр-на	Выведение мочк-ты за сутки	Выведение кр-на за сутки	Площадь поверхности тела (ППТ)
Референтные значения	0,5–1,5 мл/мин	1,48–4,43 ммоль/сутки	Муж.– 210–420, жен.– 150–350 мкмоль/л	Муж.– 7,1–17 ммоль/л, жен.– 5,6–15,8 ммоль/л	Муж.– 72–115, жен.– 58–96 мкмоль/л	–	–	5,4–9 мл/мин	64–126 мл/мин	1,48–4,43 mM/сутки	формула Мостеллера = корень ((рост, см х вес, кг)/3600))
«быстрые» ацетилятоты (определенные с помощью ПЦР), $n=19$											
Среднее знач.	1,054	2238,03	294,60	8414,84	88,57	0,1309	8,152	99,24	3,389	12,54	1,998
СО	0,160	379,43	50,89	1070,61	9,43	0,0366	1,966	9,85	0,766	0,61	0,194
СОС	0,037	87,05	11,68	245,61	2,16	0,0084	0,451	2,26	0,176	0,14	0,045
«медленные» ацетилятоты (определенные с помощью ПЦР), $n=13$											
Среднее знач.	1,02	2129,83	279,48	9006,59	83,29	0,0880	7,80	108,20	3,09	12,84	2,020
СО	0,20	389,37	35,75	1669,47	10,00	0,0330	1,93	11,07	0,65	0,55	0,198
СОС	0,06	107,99	9,92	463,03	2,77	0,0092	0,54	3,07	0,18	0,15	0,055
Различия между «быстрыми» и «медленными», $p<0,05$	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечания: МД – минутный диурез; UA – мочевая кислота; ОП-272 – оптическая плотность мочи после предварительного центрифугирования, измеренная при 272 нм; ППТ – площадь поверхности тела; СО – стандартное отклонение, СОС – стандартная ошибка среднего; данные представлены как ср.арифм.±стошибка ср.арифм.

ТАБЛИЦА 6
**ПОКАЗАТЕЛИ КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ ПОСЛЕ УПОТРЕБЛЕНИЯ КОФЕИНА
 В КАЧЕСТВЕ ТЕСТОВОГО ПРЕПАРАТА, $n = 32$**

После приема кофеина	МД	UA мочи	UA сыворотки крови	Креатинин мочи	Креатинин сыворотки крови	ОП-272	Клиренс UA	Клиренс кр-на	Выведение моч.к-ты за сутки	Выведение кр-на за сутки	ИПП с коррекц. на площадь тела
Референтные значения											
0,5–1,5 мл/мин	1,48–4,43 ммоль/ сутки	140–210– 150–350 мкмоль/л	Муж. – 7,1–17 420, жен. – 5,6– 15,8 ммоль/л	Муж. – 72–115, жен. – 58–96 мкмоль/л	Муж. – 72–115, жен. – 58–96 мкмоль/л	–	–	5,4–9 мл/ мин	64–126 мл/ мин	1,48–4,43 mM/ сутки	8,84–13,3 mM/ сутки
Среднее знач.	1,090	2280,2	304,03	8367,3	85,68	0,1990	8,265	105,49	3,549	12,90	8,22
СО	0,165	343,2	45,85	1047,9	9,13	0,1788	1,776	10,46	0,595	0,72	3,99
СОС	0,038	78,73	10,52	240,41	2,09	0,0410	0,407	2,40	0,137	0,17	0,917
«быстрые» ацетилятоты (определенные с помощью ПЦР), $n = 19$											
Среднее знач.	1,053	2210,54	293,10	9035,08	84,15	0,1050	7,925	110,84	3,297	13,26	4,84
СО	0,209	405,37	38,66	1665,38	11,16	0,0381	1,860	12,46	0,676	0,58	2,08
СОС	0,058	112,43	10,72	461,89	3,09	0,0106	0,516	3,46	0,188	0,16	0,578
«медленные» ацетилятоты (определенные с помощью ПЦР), $n = 13$											
Среднее знач.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
СО	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
СОС	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Различия между «быстрыми» и «медленными», $p < 0,05$											
<i>p < 0,05</i>											

Примечания: МД – минутный днурез, UA – мочевая кислота, ПЦР – генетический анализ, ± ст.ошибка с-раифм.

ТАБЛИЦА 7

ФАКТИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ОБЪЕКТОВ «ОБУЧАЮЩЕЙ» ВЫБОРКИ (ПАЦИЕНТЫ СО СТЕНОЗАМИ ПОЗВОНОЧНОГО КАНАЛА), $n = 52$

Классификация	Positive («быстрые»)	Negative («медленные»)
«Быстрые»	Истинно положительные (TP) 28	Ложно положительные (FP) 2
«Медленные»	Ложно отрицательные (FN) 2	Истинно отрицательные (TN) 20
Чувствительность Se = 93,3%, специфичность Sp=90,91%		

ТАБЛИЦА 8

ФАКТИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ОБЪЕКТОВ ТЕСТОВОЙ ВЫБОРКИ (КОНТРОЛЬНАЯ ГРУППА), $n = 32$

Классификация	Positive («быстрые»)	Negative («медленные»)
«Быстрые»	Истинно положительные (TP) 17	Ложно положительные (FP) 1
«Медленные»	Ложно отрицательные (FN) 2	Истинно отрицательные (TN) 12
Чувствительность Se = 89,47%, специфичность Sp=92,3%		

Ранее мы заметили, что после приема кофеина у большинства быстрых ацетилаторов несколько увеличивался клиренс мочевой кислоты и ОП мочи на 272 нм. Однако эти изменения было нелегко обнаружить, так как при обычной лабораторной практике ошибка определения могла нивелировать эти сдвиги. Поэтому мы решили учесть все изменяющиеся показатели в совокупности, чтобы достичь уровня значимости и оценить взаимосвязи с активностью ацетилирования, чтобы выбрать самые подходящие. Определение фенотипа по клиренсу мочевой кислоты после приема кофеина применялось другими исследователями [23, 26], такой метод хорошо работает на пациентах без почечной патологии. Стандартизацию по креатинину в моче при измерении 14 метаболитов кофеина выполняли в работе Chen X. с соавт., но другим методом [24]. Предлагаемая нами технология обеспечивает более точное определение с учетом функциональной выделительной активности почек (введение в расчет клиренса креатинина). Спектрофотометрическое измерение оптической плотности на 272 нм соответствует максимуму поглощения кофеина и его основных метаболитов.

Самым точным методом оценки фенотипа NAT2 все же является оценка метаболитов кофеина в моче с помощью высокоеффективной жидкостной хроматографии или масс-спектрометрии [24]. Однако эти методы довольно дороги, трудоемки и требуют специально обученного персонала.

Есть и некоторые несоответствия теоретически ожидаемым результатам и ограничения, о которых тоже нужно сообщить. Поскольку кофеин стимулирует диурез за счет усиления почечного кровотока и скорости клубочковой фильтрации, логично было ожидать, что в нашем исследовании должно увеличиться значение минутного диуреза после применения кофеина [27],

TABLE 7

THE ACTUAL CONDITION OF THE OBJECTS OF THE “TRAINING” SAMPLE (PATIENTS WITH SPINAL CANAL STENOSIS), $n = 52$

TABLE 8

THE ACTUAL CONDITION OF THE OBJECTS IN THE TEST SAMPLE (CONTROL GROUP), $n = 32$

28, 29]. Однако в нашем исследовании явного увеличения минутного диуреза не отмечалось ни в одной группе, если у некоторых людей такие изменения и были, то в общей совокупности не было достигнуто уровней значимости. Возможно, причиной этому был небольшой объем выборки, что также мы относим к ограничениям нашего исследования.

Кофеин первоначально метаболизируется ферментом цитохромом P450 (CYP1A2) до параксантина, который затем может ацетилироваться с помощью NAT2. Ферменты цитохромов при этом в отличие от NAT2 могут быть источниками активных форм кислорода, а с другой стороны, продуцируемые митохондриями супероксиды и пероксинитрит могут необратимо ингибиовать NAT2 [30].

Сложность однозначной интерпретации заключается в том, что фермент уриказа, используемый для биохимического определения мочевой кислоты (тест-система Vital, Россия) обладает высокой, но не абсолютной специфичностью. Поэтому этот фермент, хоть и с более меньшей скоростью и более низким сродством к субстрату, но все же теоретически может окислять и другие структурно похожие ксантины, включая метаболиты кофеина. Таким образом, часть H_2O_2 , которая далее должна будет участвовать в образовании измеряемой окраски, будет образована не только из мочевой кислоты, но и из метаболитов кофеина. С другой стороны, известно ингибирующее действие кофеина и его метаболитов на фермент ксантинооксидазу, которая также действует параллельно с NAT2. Угнетение активности ксантинооксидазы может способствовать необходимости более активной работы NAT2 [31]. Таким образом, теоретически могут возникнуть два противоположно направленных эффекта: 1 – метаболиты кофеина в пробе крови (*in vitro*) могут дать ложнозаданный результат определения мочевой кислоты

из-за взаимодействия с уриказой, входящей в состав реакционной смеси, 2 – физиологический эффект кофеина (*in vivo*), с другой стороны, может подавлять образование мочевой кислоты из-за ингибиции ксантинооксидазы [31]. Исследование тонких механизмов биохимии выведения кофеина из организма не являлось целью нашей работы, но мы попытались отразить возможные затруднения, связанные с преаналитическим и аналитическим этапом лабораторных исследований. Для разрешения возможных затруднений, получения неоднозначных результатов и неточностей анализа необходимо провести дополнительные исследования с использованием выборки большего объема, а также провести валидацию разработанного метода на независимой выборке пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определение фенотипа ацетилирования с помощью расчета индивидуального интегрального диагностического показателя с использованием данных определения мочевой кислоты и креатинина с поправкой на оптические характеристики мочи после приема кофеина и учетом динамики изменения показателей, позволяет по анализу крови и мочи определять скорость реакций ацетилирования для прогнозирования исходов лечения в зависимости от полиморфного варианта NAT2 с выделением групп риска. Проведенная работа позволяет выявить индивидуальные различия в метabolизме соединительной ткани и использовать их для поиска новых звеньев патогенеза, реализации механизмов боли и фиброзирования. Однако, недостаточно обширная когорта обследованных с помощью этой технологии лиц, накладывает некоторые ограничения, желательно подтвердить результаты более масштабными исследованиями. Также следует отметить, что соблюдение преаналитического этапа лабораторных исследований критически необходимо для получения надежных результатов.

Предлагаемый нами алгоритм позволяет по анализу крови и мочи прогнозировать скорость реакций ацетилирования, которые принимают активное участие в метаболизме соединительной ткани, а также вполне могут участвовать в реализации механизмов боли и фиброобразования. Такой метод способствует выявлению и исследованию метаболических вариантов течения дегенеративно-дистрофической патологии позвоночника, а также может указать на подходы к профилактике эпидуральных фиброзирующих процессов, а также разработке прогнозирования исходов оперативного лечения, в зависимости от полиморфного варианта NAT2.

Финансирование

Работа выполнена в рамках бюджетной темы ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» «Совершенствование методов диагностики, профилактики и лечения дегенеративно-дистрофических

заболеваний позвоночника и таза на основе управления патофизиологическими механизмами в формировании патологии».

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Walls KM, Joh JY, Martinez MM, Hong KU, Hein DW. Metabolic effects of heterocyclic amines on insulin-induced AKT phosphorylation and gluconeogenic gene expression are modified by N-acetyltransferase 2 genetic polymorphism. *Pharmacogenet Genomics*. 2025; 35(4): 119-126. doi: 10.1097/FPC.0000000000000559
2. Тийс Р.П., Осипова Л.П., Галиева Э.Р., Личман Д.В., Воронина Е.Н., Мелихова А.В., и др. Полиморфизм вариантов гена N-ацетилтрансферазы 2 (NAT2) и анализ генной сети. *Биомедицинская химия*. 2021; 67(3), 213-221. [Tiis RP, Osipova LP, Galieva ER, Lichman DV, Voronina EN, Melikhova AV, et al. N-acetyltransferase (NAT2) gene polymorphism and gene network analysis. *Biomed Khim*. 2021; 67(3): 213-221. (In Russ.)]. doi: 10.18097/PBMC20216703213
3. Choudhury C, et al. The arylamine N-acetyltransferases as therapeutic targets in metabolic diseases associated with mitochondrial dysfunction. *Pharmacological Reviews*. 2024; 76(2): 300-320. doi: 10.1124/pharmrev.123.000835
4. Salazar-González RA, Turiján-Espinoza E, Hein DW, Milán-Segovia RC, Uresti-Rivera EE, Portales-Pérez DP. Expression and genotype-dependent catalytic activity of N-acetyltransferase 2 (NAT2) in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by Sirtuin 1. *Biochem Pharmacol*. 2018; 156: 340-347. doi: 10.1016/j.bcp.2018.08.034
5. Никишина М.В., Вавилин В.А., Макарова С.И., Ляхович В.В. Анализ ассоциаций полиморфизмов гена NAT2 с риском возникновения рака легкого. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2007; 143(1): 89-92. [Nikishina MV, Vavilin VA, Makarova SI, Lyakhovich VV. Analysis of associations of polymorphisms of the NAT2 gene with the risk of lung cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2007; 143(1): 89-92. (In Russ.)].
6. Silva IMD, Vacario BGL, Okuyama NCM, Barcelos GRM, Fuganti PE, Guembarovski RL, et al. Polymorphisms in drug-metabolizing genes and urinary bladder cancer susceptibility and prognosis: Possible impacts and future management. *Gene*. 2024; 907: 148252. doi: 10.1016/j.gene.2024.148252
7. Elsalem L, Al Shatnawi A, A Alfaqih M, Alshoh A, Al Demour S, Al-Daghmin A, Halalsheh O, et al. Discovery of a novel genetic variant in the N-acetyltransferase2 (NAT2) gene that is associated with bladder cancer risk. *Acta Biochim Pol*. 2023; 70(3): 575-582. doi: 10.18388/abp.2020_6590
8. Camporez JP, Wang Y, Faarkrog K, Chukijrungroat N, Petersen KF, Shulman GI. Mechanism by which

- arylamine N-acetyltransferase 1 ablation causes insulin resistance in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114(52): E11285-E11292. doi: 10.1073/pnas.1716990115
9. Walls KM. Heterocyclic amines and arylamine N-acetyltransferase 2 polymorphism in pathogenesis of insulin resistance. – 2021.
10. Самгина Т.А. Влияние некоторых факторов риска и полиморфизма rs1799930 гена NAT2-590 G>A на развитие хронического панкреатита. *Научные результаты биомедицинских исследований.* 2021; 7(2): 143-148. [Samgina TA. The influence of certain risk factors and polymorphism rs1799930 of the NAT2-590 G>A gene on the development of chronic pancreatitis. *Scientific results of biomedical research.* 2021; 7(2): 143-148. (In Russ.)]. doi: 10.18413/2658-6533-2021-7-2-0-4
11. Schnuch A, Westphal GA, Müller MM, Schulz TG, Geier J, Brasch J, et al. Genotype and phenotype of N-acetyltransferase 2 (NAT2) polymorphism in patients with contact allergy. *Contact Dermatitis.* 1998; 38(4): 209-11. doi: 10.1111/j.1600-0536.1998.tb05709.x
12. Santos EC, Pinto AC, Klumb EM, Macedo JM. Polymorphisms in NAT2 (N-acetyltransferase 2) gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Rev Bras Reumatol Engl Ed.* 2016; 56(6): 521-529. doi: 10.1016/j.rbre.2016.09.015
13. Petryszyn P, Zurakowski G, Dudkowiak R, Machowska M, Grupa A, Ekk-Cierniakowski P, et al. The N-Acetyltransferase 2 Polymorphism and Susceptibility to Inflammatory Bowel Disease: A Case-Control Study. *Pharmacol Res Perspect.* 2025; 13(1): e70040. doi: 10.1002/prp2.70040
14. Amorim G, Jaworski J, Yang J, Cordeiro-Santos M, Krtski AL, Figueiredo MC, et al. Pharmacogenetics of tuberculosis treatment toxicity and effectiveness in a large Brazilian cohort. *Pharmacogenet Genomics.* 2025; 35(2): 55-64. doi: 10.1097/FPC.0000000000000552
15. van Amerongen CCA, Kramer D, Pas HH, Schutteelaar MLA. The expression pattern of N-acetyltransferase 1 in healthy human skin. *Contact Dermatitis.* 2021; 85(1): 1-6. doi: 10.1111/cod.13821
16. Salazar-González RA, Turiján-Espinoza E, Hein DW, Milán-Segovia RC, Uresti-Rivera EE, Portales-Pérez DP. Expression and genotype-dependent catalytic activity of N-acetyltransferase 2 (NAT2) in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by Sirtuin 1. *Biochem Pharmacol.* 2018; 156: 340-347. doi: 10.1016/j.bcp.2018.08.034
17. Hernández-González O, Martínez-Leija ME, Paz-Rodríguez VA, Portales-Pérez DP. Arylamines N-acetyltransferases 1 and 2: physiology, genetics and epigenetics. *Gac Med Mex.* 2024; 160(5): 473-479. doi: 10.24875/GMM. M24000946
18. Kresyun VJ, Mehlnychenko MG, Antonenko PB, Antonenko KO, Kvashnina AA. Adhesion ileus in children in the connective tissues dysplasia. *Klin Khir.* 2016; (10): 21-5.
19. Nakai T, Sakai D, Nakamura Y, Horikita N, Matsushita E, Naiki M, et al. Association of NAT2 genetic polymorphism with the efficacy of Neurotropin® for the enhancement of aggrecan gene expression in nucleus pulposus cells: a pilot study. *BMC Med Genomics.* 2021; 14(1): 79. doi: 10.1186/s12920-021-00926-x
20. Родионова Л.В., Сороковиков В.А., Кошкарева З.В. Активность ферментных систем и метаболизм соединительной ткани в патогенезе стенозирующего процесса позвоночного канала (обзор литературы). *Acta Biomedica Scientifica.* 2015; 1: 77-83. [Rodionova LV, Sorokovikov VA, Koschkareva ZV. Enzyme systems activity and connective tissue metabolism as pathogenetic factors of spinal stenosis (literature review). *Acta Biomedica Scientifica.* 2015; 1: 77-83. (In Russ.)].
21. Lopes MQP, Teixeira RLF, Cabello PH, Nery JAC, Sales AM, Nahn JREP, et al. Human N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene variability in Brazilian populations from different geographical areas. *Front Pharmacol.* 2023; 14: 1278720. doi: 10.3389/fphar.2023.1278720
22. Al-Ahmad MM, Amir N, Dhanasekaran S, John A, Abdulrazzaq YM, Ali BR, et al. Studies on N-Acetyltransferase (NAT2) Genotype Relationships in Emiratis: Confirmation of the Existence of Phenotype Variation among Slow Acetylators. *Ann Hum Genet.* 2017; 81(5): 190-196. doi: 10.1111/ahg.12198
23. Буловская Л.Н., Борисенко Г.Н., Дробаченко О.А. и др. Определение фенотипа N-ацетилтрансферазной активности. *Лабораторное дело.* 1990; 10: 28-30. [Bulovskaya LN, Borisenko GN, Drobachenko OA, et al. Determination of the phenotype of N-acetyltransferase activity. *Laboratory work.* 1990; 10: 28-30. (In Russ.)].
24. Chen X, Guo Q, Li J, et al. The association between urinary caffeine and caffeine metabolites and diabetic retinopathy in individuals with diabetes: NHANES 2009–2014. *Sci Rep.* 2025; 15: 15827. doi: 10.1038/s41598-025-01088-x
25. Hill GM, Moriarity DM, Setzer WN. Attenuation of cytotoxic natural product DNA intercalating agents by caffeine. *Sci Pharm.* 2011; 79(4): 729-47. doi: 10.3797/scipharm.1107-19
26. Палковский О.Л., Михайлова Е.И., Кудря А.А., Шестопалов М.Ю. Клиренс мочевой кислоты как фармакогенетический маркер в определении фенотипа N-ацетилирования. Мат.конф. «Вопросы организации и информатизации здравоохранения». 2015: 79–83. [Palkovsky OL, Mikhailova EI, Kudrya AA, Shestopalov MY. Uric acid clearance as a pharmacogenetic marker in determining the phenotype of N-acetylation. Mat.conf. "Issues of organization and informatization of healthcare". 2015; 79-83. (In Russ.)].
27. Chavez Valdez R, Ahlawat R, Wills-Karp M, Nathan A, Ezell T, Gauda EB. Correlation between serum caffeine levels and changes in cytokine profile in a cohort of preterm infants. *J Pediatr.* 2011; 158(1): 57-64. doi: 10.1016/j.jpeds.2010.06.051
28. Fujii R, Nakatochi M, Del Greco MF. Coffee Intake, Plasma Caffeine Levels, and Kidney Function: Two-Sample Mendelian Randomization among East Asian and European Ancestries. *Kidney Int Rep.* 2024; 9(4): 1083-1092. doi: 10.1016/j.kir.2024.01.024
29. Chen S, Zhang H, Su Q, Lin X, Kang K, Zhou Z, et al. Caffeine Intake Attenuates the Association of Cadmium Exposure with Cardiovascular Disease: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2016.

Cardiovasc Toxicol. 2025; 25(10): 1506-1522. doi: 10.1007/s12012-025-10031-5

30. Jaeschke H, Ramachandran A. Oxidant Stress and Lipid Peroxidation in Acetaminophen Hepatotoxicity. *React Oxyg Species (Apex)*. 2018; 5(15): 145-158.

31. Wu D, Chen R, Zhang W, Lai X, Sun L, Li Q, et al. Tea and its components reduce the production of uric acid by inhibiting xanthine oxidase. *Food Nutr Res.* 2022; 66. doi: 10.29219/fnr.v66.8239

Сведения об авторах

Родионова Любовь Викторовна – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией клеточной патофизиологии и биохимии, ведущий научный сотрудник ФГБНУ Иркутский научный центр хирургии и травматологии; e-mail: greidmacho@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5080-9225>

Животенко Александр Петрович – научный сотрудник НКО нейрохирургии ФГБНУ Иркутский научный центр хирургии и травматологии; e-mail: sivotenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4032-8575>

Самойлова Лилия Григорьевна – младший научный сотрудник лаборатории клеточной патофизиологии и биохимии ФГБНУ Иркутский научный центр хирургии и травматологии; e-mail: popovalg@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4482-6130>

Ларинов Сергей Николаевич – зав. НКО нейрохирургии ФГБНУ Иркутский научный центр хирургии и травматологии; e-mail: snlar@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9189-3323>

Information about the authors

Lyubov V. Rodionova – Cand. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory of Cell Pathophysiology and Biochemistry, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology; e-mail: greidmacho@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5080-9225>

Aleksandr P. Zhivotenko – Research Officer at the Clinical Research Department of Neurosurgery, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology; e-mail: sivotenko1976@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4032-8575>

Liliya G. Samoilova – Junior Research Officer at the Laboratory of Cell Pathophysiology and Biochemistry, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology; e-mail: popovalg@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4482-6130>

Sergey N. Larinov – Dr. Sc. (Med.), Leading Research Officer at the Clinical Research Department of Neurosurgery, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology; e-mail: snlar@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9189-3323>