

УДК 577.112.3

<https://doi.org/10.23888/HMJ202193369-376>

Влияние металлов переменной валентности на окислительную модификацию аминокислотных остатков альбумина

О. А. Завьялова^{1✉}, Ю. А. Марсянова¹, Ю. В. Абаленихина¹, А. Ф. Иштулин¹, А. Е. Горелова²¹Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Рязань, Российская Федерация²Городская клиническая больница № 11, Рязань, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Ольга Алексеевна Завьялова, olga.zavyalova.1999@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Постоянство белкового состава организма является одним из важнейших условий нормальной жизнедеятельности. Отклонения в содержании основных биоэлементов, в частности металлов с переменной валентностью, вызванные экологическими факторами, неправильным питанием и другими приводят к различным нарушениям. Одним из свойств металлов переменной валентности является способность вызывать в совместном действии с активными формами кислорода металл-катализируемое окисление белков. Представляется интересным изучить окислительную модификацию аминокислотных остатков альбумина и изменение его свойств.

Цель. Изучить влияние активных форм кислорода, генерируемых по реакции Фентона в присутствии Fe^{2+} и Cu^{2+} , на окислительную модификацию аминокислотных остатков бычьего сывороточного альбумина.

Материалы и методы. Исследование проводили на бычьем сывороточном альбумине (БСА), который инкубировали в течение 2 часов в смеси реактивов Фентона — $FeSO_4 + H_2O_2$ и в смеси $CuSO_4 + H_2O_2$. Количественное содержание белка в пробах определяли с реактивом бромкрезоловый зеленый («Альбумин-Ольвекс»). Оценку содержания карбонильных производных белков проводили по методу R. L. Levine в модификации Е. Е. Дубининой. Содержание тиоловых групп в образцах альбумина контрольной и экспериментальных групп определяли по методу Элмана с DTNB в неденатурирующих условиях.

Результаты. Представленные результаты демонстрируют, что под действием ионов Cu^{2+} формирование карбонильных производных алифатических аминокислот альбумина меньше, чем в присутствии Fe^{2+} , что может объясняться разной степенью аффинности альбумина к металлам переменной валентности. Скорость подвижности окислительно-модифицированного альбумина в полиакриламидном геле снижается, что объясняется агрегацией белка за счет битирозиновых сшивок.

Заключение. Металлы переменной валентности влияют на модификацию альбумина. Изменение функциональных свойств белка имеет физиологическое значение, в том числе при экстрацеллюлярной мобилизации железа и меди.

Ключевые слова: окисленный альбумин, металлы переменной валентности, карбонильные производные белков, электрофорез

Для цитирования:

Завьялова О. А., Марсянова Ю. А., Абаленихина Ю. В., Иштулин А. Ф., Горелова А. Е. Влияние металлов переменной валентности на окислительную модификацию аминокислотных остатков альбумина // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2021. Т. 9, № 3. С. 369–376. <https://doi.org/10.23888/HMJ202193369-376>.

<https://doi.org/10.23888/HMJ202193369-376>

The influence of metals of variable valence on the oxidative modification of albumin amino acid residues

Ol'ga A. Zav'yalova¹✉, Yuliya A. Marsyanova¹, Yuliya V. Abalenikhina¹, Artem F. Ishtulin¹, Anna E. Gorelova²

¹Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

²Municipal Clinical Hospital № 11, Ryazan, Russian Federation

Corresponding author: Ol'ga A. Zav'yalova, olga.zavyalova.1999@mail.ru

ABSTRACT

BACKGROUND: The constancy of the protein composition of the body is one of the most important conditions for normal vital activity. Deviations in the content of the main bioelements, in particular, mixed valence metals, caused by environmental factors, improper nutrition and other factors, lead to various disorders. One of the properties of metals of mixed valence is the ability to cause metal-catalyzed oxidation of proteins in joint action with active forms of oxygen. It seems interesting to study the oxidative modification of the amino acid residues of albumin and the change in its properties.

AIM: To study the effect of reactive oxygen intermediates generated by the Fenton reaction in the presence of Fe^{2+} and Cu^{2+} on the oxidative modification of amino acid residues of bovine serum albumin.

MATERIALS AND METHODS: The study was carried out on bovine serum albumin (BSA), which was incubated for 2 hours in a mixture of Fenton's reagents – $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ and in a mixture of $\text{CuSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$. The quantitative protein content in the samples was determined with the bromocresol green reagent (Albumin-Olvex). The content of carbonyl derivatives of proteins was estimated by the method of R.L. Levine modified by E.E. Dubinina. The content of thiol groups in albumin samples from the control and experimental groups was determined by the Ellman method with DTNB (under non-denaturing conditions).

RESULTS: The presented results demonstrate that under the action of Cu^{2+} ions, the formation of carbonyl derivatives of aliphatic amino acids of albumin is less than in the presence of Fe^{2+} , which can be explained by the different degrees of albumin affinity to metals of variable valence. The rate of mobility of oxidatively modified albumin in polyacrylamide gel decreases, which is explained by protein aggregation due to bityrosine cross-links.

CONCLUSION: Variable valence metals affect the modification of albumin. The change in the functional properties of the protein is of physiological significance, including the case of extracellular mobilization of iron and copper.

Keywords: oxidized albumin, variable valence metals, carbonyl derivatives of proteins, electrophoresis

For citation:

Zav'yalova O. A., Marsyanova Yu. A., Abalenikhina Yu. V., Ishtulin A. F., Gorelova A. E. The influence of metals of variable valence on the oxidative modification of albumin amino acid residues. *Science of the young (Eruditio Juvenium)*. 2021; 9(3):369–376. <https://doi.org/10.23888/HMJ202193369-376>.

Обоснование

Постоянство белкового состава организма является одним из важнейших условий нормальной жизнедеятельности. Отклонения в содержании основных биоэлементов (Fe, Cu, Cr, Mn и др.), вызванные экологическими факторами, неправильным питанием и другими приводят к различным нарушениям. Среди биоэлементов особая роль принадлежит металлам с переменной валентностью, так как они обладают высокой реакционной способностью. Ион металла реагирует с пероксидом водорода, что приводит к генерации активных форм кислорода [1].

Одно из главных свойств металлов переменной валентности вызывать в совместном действии с активными формами кислорода металл-катализируемое окисление белков. Результатом этих превращений служит окисление аминокислотных остатков и образование карбонильных производных [2]. Окисление белков происходит в области металл-связывающей поверхности, где осуществляется модификация аминокислотных остатков. Известен механизм металл-катализируемого окисления — взаимодействие остатка лизина с катионом Fe^{2+} или Cu^{2+} , в результате чего образуется металл-белковый координационный комплекс.

Доказано, что окисление может происходить при участии активных форм кислорода не только по алифатическим незамещенным аминокислотным остаткам, но и серосодержащим, а также по остаткам тирозина и триптофана [3].

В связи с тем, что в альбумине высокое содержание лизина, треонина, метионина, изолейцина, триптофана, тирозина [2], интересным представляется изучить окислительную модификацию аминокислотных остатков альбумина и изменение его свойств. Таким образом, целью исследования стало изучить влияние активных форм кислорода, генерируемых по реакции Фентона в присутствии Fe^{2+} и Cu^{2+} , на окислительную модификацию аминокислотных остатков бычьего сывороточного альбумина.

Материалы и методы

Исследование проводили на бычьем сывороточном альбумине (БСА), который инкубировали в течение 2 часов в смеси реактивов Фентона — $FeSO_4 + H_2O_2$ (эксперимент 1, $n = 8$) и в смеси $CuSO_4 + H_2O_2$ (эксперимент 2, $n = 8$). В качестве контроля использовали БСА, который инкубировали в течение 2 часов в физиологическом растворе без участия металлов переменной валентности ($n = 8$).

Количественное содержание белка в пробах определяли с реактивом бромкрезоловый зеленый («Альбумин-Ольвекс» производителя «Ольвекс Диагностикум»). Метод основан на образовании окрашенных комплексных соединений при взаимодействии альбумина с бромкрезоловым зеленым в слабокислой среде. Интенсивность окраски при длине волны 630 нм прямо пропорциональна концентрации альбумина.

Оценку содержания карбонильных производных белков проводили по методу R. L. Levine в модификации E. E. Дубининой [4]. Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов регистрировали на спектрофотометре в диапазоне 230–535 нм и подсчитывали площадь под кривой спектра поглощения.

Интенсивность окислительной модификации белка по тирозиновым и триптофановым аминокислотным остаткам оценивали флуоресцентным методом. Флуоресценцию триптофана регистрировали при длине волны возбуждения 295 нм и длине волны испускания 340 нм [7]. Флуоресценцию битирозина регистрировали при длине волны возбуждения 325 нм и длине волны испускания 415 нм [5, 6]. У триптофана и тирозина примерно одинаковые квантовые выходы флуоресценции, но поскольку молярный коэффициент поглощения триптофана на порядок больше, чем тирозина, то и флуоресцирует он сильнее; флуоресценцией остальных аминокислот можно пренебречь. Полученные результаты выражали в единицах флуоресценции, отнесенных на грамм белка.

Содержание тиоловых групп в образцах альбумина контрольной и экспериментальных групп определяли по методу Элмана с DTNB (5,5'-дитиобис (2-нитро) бензоатом) («Serva», Германия) в неденатурирующих условиях. При реакции сульфгидрильных (тиоловых) групп с

реактивом Элмана происходит разрыв дисульфидной связи в реактиве, и образуется 2-нитро-5-тиобензойная кислота, которая легко переходит в хиноидную форму в воде при нейтральных и щелочных рН и имеет ярко-жёлтую окраску.



Рис. 1. Образование 2-нитро-5-тиобензойной кислоты.

Концентрацию SH-групп рассчитывают, исходя из коэффициента экстинкции $E = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. В качестве стандартного раствора для построения калибровочной кривой использовали восстановленный раствор глутатиона в диапазоне концентраций $0,01\text{--}1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [8].

Раствор альбумина подвергали неокрашенному нативному вертикальному электрофорезу в 8% полиакриламидном геле (CN-PAGE). Для визуализации результата, пластинки геля выдерживали в растворе кумасси бриллиантового синего в течение 12 часов. Затем гель промывали раствором уксусной кислоты (7%) для удаления избытка красителя, далее гелевую пластинку промывали дистиллированной водой и сканировали [9].

Количественную оценку окисления аминокислотных остатков альбумина проводили с помощью компьютерной программы [10], результаты представлены в виде Me [Q1; Q3], где Me — медиана, Q1 — минимальное, а Q3 — максимальное значение вариационного ряда. Оценку значимости отличий между сравниваемыми группами проводили по критерию Манна-Уитни и обрабатывали с помощью компьютерной программы Statistica 12. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В качестве металл-зависимого окисления белков был выбран механизм реакции Фентона, которая широко использу-

ется в практике научных исследований как источник гидроксильных радикалов. Реакцию Фентона используют для образования свободных радикалов с целью последующего определения антиоксидантной способности реагирующих веществ. Эксперимент был проведен и с ионами меди, которые также способны изменять свою степень окисления при действии на белковые комплексы [2].



После экспозиции белка с добавлением реакционной смеси степень повреждения алифатических аминокислот оценивали по содержанию карбонильных производных белков.

Уровень карбонильных производных белка в экспериментальной группе 1 (железо-зависимое окисление) и экспериментальной группе 2 (медь-зависимое окисление) был статистически значимо выше, чем в контрольной группе (табл. 1).

При окислительном повреждении альбумина по алифатическим аминокислотным остаткам преимущественно формируются альдегидные производные, если в качестве металла переменной валентности в реакции Фентона выступает Fe^{2+} , и кетоновые производные — если Cu^{2+} .

Полученные результаты свидетельствуют об активном окислительном стрессе, индуцируемом по реакции Фентона,

Таблица 1. Уровень карбонильных производных в бычьем сывороточном альбумине при окислительном стрессе, индуцируемом по реакции Фентона, Me [Q1; Q3]

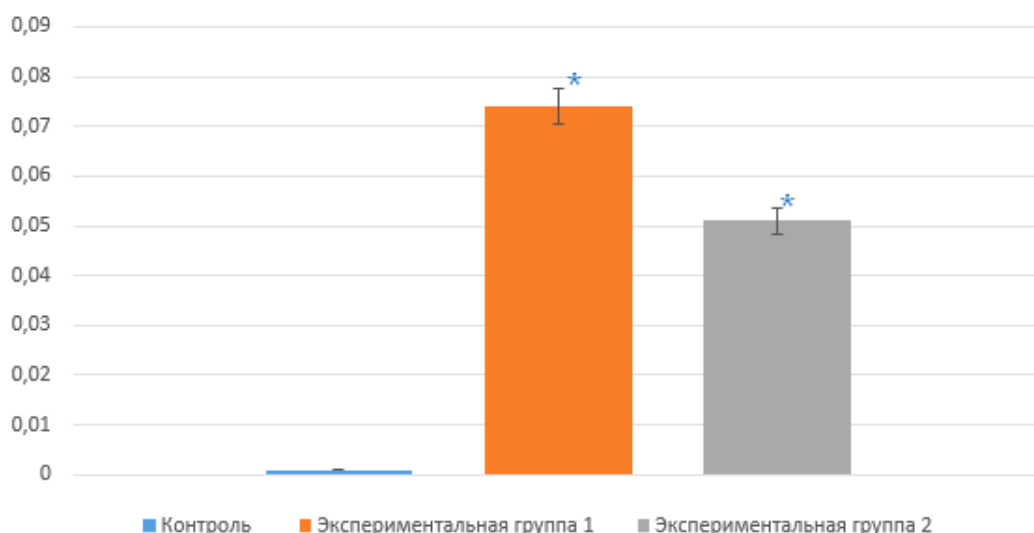
	Контроль	Экспериментальная группа 1	Экспериментальная группа 2
Общее содержание карбонильных производных (е.о.п./г белка)	0,01 [0,001;0,011]	0,62 [0,44; 0,65]*	0,52 [0,32; 0,54]*
АДНФГ (е.о.п./г белка)	0,008 [0,008; 0,008]	0,4 [0,31; 0,46]*	0,39 [0,21; 0,48]*
КДНФГ (е.о.п./г белка)	0,002 [0,002; 0,004]	0,22 [0,13; 0,23]*	0,13 [0,1; 0,2]*
Доля первичных маркеров, %	80 [66,7; 80]	64,5 [50; 74,2]	75 [40,4; 92,3]
Доля вторичных маркеров, %	20 [20; 33,3]	35,5 [20,9; 37,1]	25 [19,2; 38,5]

Примечание: * — статистически значимые отличия от группы контроля ($p < 0,05$)

при этом Cu^{2+} способствует более глубокому окислению и формированию вторичных маркеров окислительного стресса [1].

Под действием активных форм ки-

слорода в экспериментальных группах 1 и 2 наблюдается увеличение флуоресценции битирозина, что свидетельствует о его окислении (рис. 2).

**Рис. 2.** Изменение флуоресценции битирозина бычьего сывороточного альбумина при окислительном стрессе, индуцируемом по реакции Фентона, ед.фл./г белка.

Примечание: * — статистически значимые отличия от группы контроля ($p < 0,05$).

Снижение флуоресценции триптофана в экспериментальных группах 1 и 2 свидетельствует об окислении этой аминокислоты (рис. 3).

Уровень тиоловых (SH-) групп в условиях представленных экспериментальных моделей статистически значимо не изменяется, так в контрольной группе данный показатель составил 0,52 [0,48; 0,56] мМ, в экспериментальной группе 1 — 0,69 [0,48; 0,9] мМ, в эксперименталь-

ной группе 2 — 0,61 [0,5; 0,72] мМ.

При проведении электрофоретического исследования нами было установлено, что подвижность белка в электрическом поле снижается в экспериментальных группах 1 и 2 (рис. 4), что свидетельствует об изменении молекулярной массы белка. Уменьшение электрофоретической подвижности обусловлено агрегацией белковых молекул за счет образования битирозиновых сшивок [9].

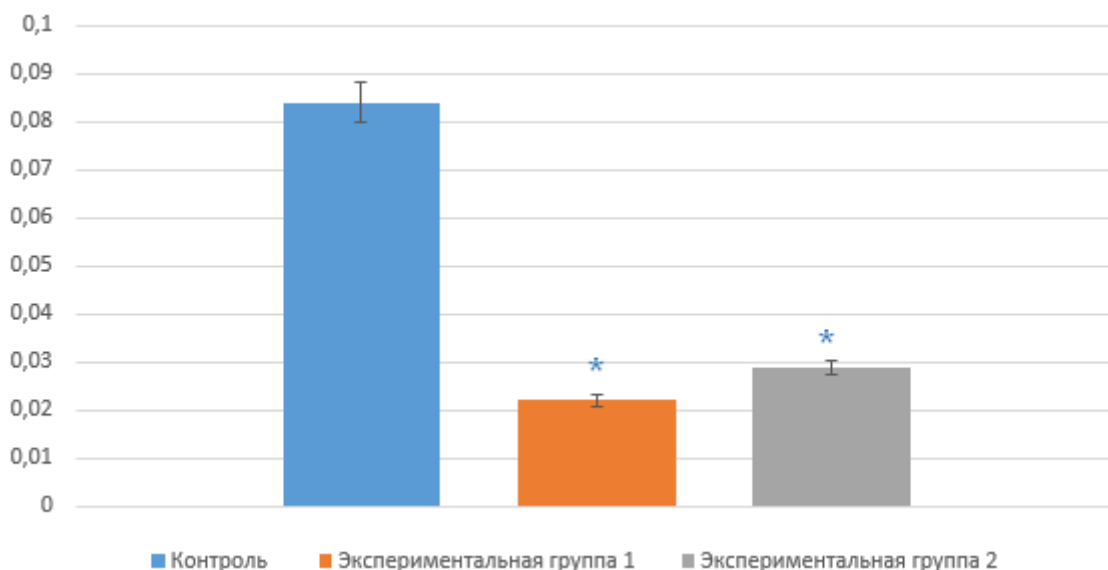


Рис. 3. Изменение флуоресценции триптофана бычьего сывороточного альбумина при окислительном стрессе, индуцируемом по реакции Фентона, ед.фл./г белка.

Примечание: * — статистически значимые отличия от группы контроля ($p < 0,05$).

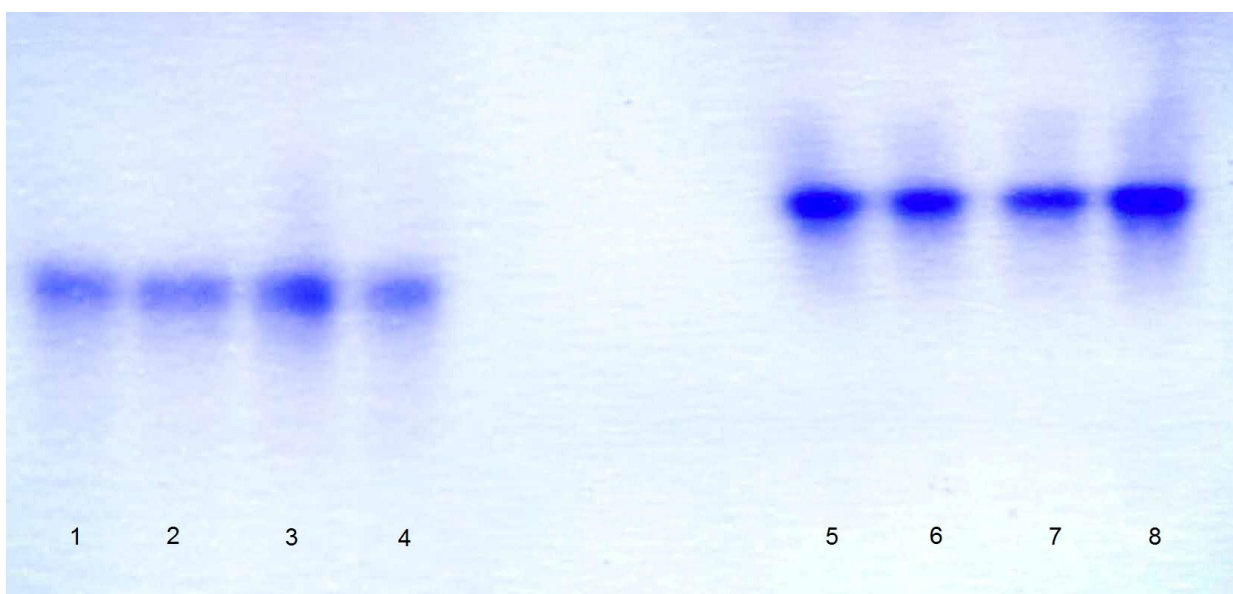


Рис. 4. Распределение зон локализации альбумина после разделения.

Примечание: 1–4 — контроль, 5, 6 — железо-зависимое окисление, 7, 8 — медь-зависимое окисление.

Модификация аминокислотных остатков альбумина при действии активных форм кислорода, генерируемых по реакции Фентона, приводит к изменению функциональной активности белка. Кроме этого, продукты повреждения белка являются не только маркерами окислительного стресса в организме, но и могут быть

промежуточными продуктами патологических процессов [11].

Заключение

Таким образом, было установлено, что металлы переменной валентности оказывают влияние на изменения окислительной модификации альбумина по ами-

нокислотным остаткам тирозина, триптофана и цистеина, а также изменяют его электрофоретическую подвижность в полиакриламидном геле. Изменение функциональных свойств белка имеет физио-

логическое значение, в том числе при экстрацеллюлярной мобилизации железа и меди, что оказывает воздействие на развитие различных патологических процессов в организме.

Список источников

1. Владимиров Ю.А., ред. Источники и мишени свободных радикалов в крови человек. М.: МАКС Пресс; 2017.
2. Аристова Н.А., Иванова И.П., Трофимова С.В., и др. Механизмы хемилуминесценции в реакции Фентона // Исследовано в России. 2011. № 067. С. 909–919. Доступно по: http://www.chemilum.ru/files/pub_fentoncl.pdf. Ссылка активна на 24 декабря 2021.
3. Щулкин А.В., Колесников А.В., Баренина О.И., и др. Роль окислительного стресса в патогенезе бактериальной язвы роговицы // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2013. № 3. С. 148–152.
4. Dubinina E.E., Gavrovskaya S.V., Kuzmich E.V., et al. Oxidative modification of proteins: oxidation of tryptophan and production of dityrosine in purified proteins using Fenton's system // Биохимия. 2002. Т. 67, № 3. С. 413–421.
5. Amadò R., Aeschbach R., Neukom H. Dityrosine: in vitro production and characterization // Methods in Enzymology. 1984. Vol. 107. P. 377–388. doi: 10.1016/0076-6879(84)07026-9
6. Абаленихина Ю.В., Фомина М.А. Состояние окислительной модификации тирозина и триптофана в условиях *in vivo*-модулирования синтеза оксида азота // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2016. № 1. С. 7–11.
7. Teale F.W. The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution // The Biochemical Journal. 1960. Vol. 76, № 2. P. 381–388. doi: 10.1042/bj0760381
8. Boschi–Muller S., Azza S., Sanglier–Cianferani S., et al. Sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* // The Journal of Biological Chemistry. 2000. Vol. 275, № 46. P. 35908–35913. doi: 10.1074/jbc.M006137200
9. Стручкова И.В., Кальясова Е.А. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле. Н. Новгород: Нижегородский университет; 2012. Доступно по: http://www.unn.ru/pages/e-library/methodmaterial/files/Struchkova_Kalyasova.pdf. Ссылка активна на 24 декабря 2021.
10. Абаленихин А.А., Абаленихина Ю.В., Груздев Е.Е., и др. Программа определения окислительной модификации альбумина сыворотки крови в норме и при патологии. Свидетельство № 2020615330. 2020614420; заявл. 18.05.2020; опубл. 21.05.2020.
11. Созарукова М.М., Проскурина Е.В., Владимиров Ю.А. Сывороточный альбумин как источник и мишень свободных радикалов в патологии // Вестник Российского государственного медицинского университета. 2016. № 1. С. 61–67.
12. Фомина М.А. [и др.] Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях. Патент РФ 2524667 РФ, МПК G01N 33/52. 2013102618/15; заявл. 21.01.2013; опубл. 27.07.2014, Бюл. №21.

References

1. Vladimirov YuA, editor. *Istochniki i misheni svobodnykh radikalov v krovi chelovek*. Moscow: MAKS Press; 2017. (In Russ).
2. Aristova NA, Ivanova IP, Trofimova SV, et al. Mechanisms of chemiluminescence in Fenton reaction. *Issledovano v Rossii*. 2011;(067):909–19. Available at: http://www.chemilum.ru/files/pub_fentoncl.pdf. Accessed: 2021 December 24. (In Russ).
3. Shchulkin AV, Kolesnikov AV, Barenina OI, et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of the bacterial corneal ulcer. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2013;(3):148–52. (In Russ).
4. Dubinina EE, Gavrovskaya SV, Kuzmich EV, et al. Oxidative modification of proteins: oxidation of tryptophan and production of dityrosine in purified proteins using Fenton's system. *Biokhimiya*. 2002;67(3):413–21. (In Russ).
5. Amadò R, Aeschbach R, Neukom H. Dityrosine: in vitro production and characterization. *Methods in Enzymology*. 1984;107:377–88. doi: 10.1016/0076-6879(84)07026-9
6. Abalenikhina JV, Fomina MA. Status of tyrosine and tryptophan oxidative modification in conditions of *in vivo* modulation of nitric oxide synthesis. *Nauka Molodykh (Eruditio Juvenium)*. 2016;(1):7–11. (In Russ).
7. Teale FW. The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution. *The Biochemical Journal*. 1960;76(2): 381–8. doi: 10.1042/bj0760381
8. Boschi–Muller S, Azza S, Sanglier–Cianferani S, et al. Sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(46):35908–13. doi: 10.1074/jbc.M006137200
9. Struchkova IV, Kal'yasova EA. *Teoreticheskiye i prakticheskiye osnovy provedeniya elektroforeza belkov v poliakrilamidnom gele*. Nizhny Novgorod: Nizhegorodskiy universitet; 2012. Available at: http://www.unn.ru/pages/e-library/methodmaterial/files/Struchkova_Kalyasova.pdf. Accessed: 2021 December 24. (In Russ).
10. Abalenikhin AA, Abalenikhina YuV, Gruzdev EE, et al. Programma opredeleniya oksislitel'noy modifikatsii al'bumina syvorotki krovi v norme i pri patologii. Certificate of ownership № 2020615330. 2020614420; statement 18.05.2020; published 21.05.2020.
11. Sozarukova MM, Proskurnina EV, Vladimirov YuA. Serum albumin as a source of and a target for free radicals in pathology. *Vestnik RGMU*. 2016;(1):61–7. (In Russ).
12. Fomina MA, et al. Sposob kompleksnoy otsenki soderzhaniya produktov oksislitel'noy modifikatsii belkov v tkanyakh i biologicheskikh zhidkostyakh. Patent RU 2524667 RU, MPK G01N 33/52. 2013102618/15; statement 21.01.2013; published 27.07.2014, bulletin № 21.

Дополнительная информация

Финансирование. Работа поддержана грантом ФГБУ «Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» № 14842ГУ/2019 от 16.12.2019.

Информация об авторах:

✉ *Ольга Алексеевна Завьялова* — студентка 5 курса лечебного факультета, olga.zavyalova.1999@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9010-385X>.

Юлия Александровна Марсянова — ассистент кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО, SPIN: 4075-3169, <https://orcid.org/0000-0003-4948-4504>.

Юлия Владимировна Абаленихина — канд. биол. наук, доцент кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО, SPIN: 4496-9027, <https://orcid.org/0000-0003-0427-0967>.

Артем Федорович Иштулин — ассистент кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО, SPIN: 8186-6398, <https://orcid.org/0000-0001-9750-1642>.

Анна Евгеньевна Горелова — ассистент кафедры урологии с курсом хирургических болезней; врач-нефролог, <https://orcid.org/0000-0002-1705-5003>.

Вклад авторов:

Марсянова Ю. А., Абаленихина Ю. В. — концепция и дизайн исследования
Завьялова О. А., Иштулин А. Ф., Горелова А. Е. — написание текста, статистическая обработка, редактирование.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Funding. The work was supported by the grant of the Federal State Budgetary Institution “Fund for Assistance to the Development of Small Forms of Enterprises in the scientific and Technical sphere” No. 14842GU/2019 dated 2019, 16 December.

Information about the authors:

✉ *Ol'ga A. Zav'yalova* — 5th-year Student of the Medical Faculty, olga.zavyalova.1999@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9010-385X>.

Yuliya A. Marsyanova — Assistant of the Department of Biological Chemistry with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics of the Faculty of Additional Professional Education, SPIN: 4075-3169, <https://orcid.org/0000-0003-4948-4504>.

Yuliya V. Abalenikhina — MD, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor of the Department of Biological Chemistry with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics of the Faculty of Additional Professional Education, SPIN: 4496-9027, <https://orcid.org/0000-0003-0427-0967>.

Artem F. Ishtulin — Assistant of the Department of Biological Chemistry with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics of the Faculty of Additional Professional Education, SPIN: 8186-6398, <https://orcid.org/0000-0001-9750-1642>.

Anna E. Gorelova — Assistant of the Department of Urology with the Course of Surgical Diseases; Nephrologist, <https://orcid.org/0000-0002-1705-5003>.

Contribution of the authors:

Marsyanova Yu. A., Abalenikhina Yu. V. — concept and design of the study.
Zav'yalova O. A., Ishtulin A. F., Gorelova A. E. — text writing, statistical processing, editing.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.