

Енолазы: ограничения внедрения в клиническую практику (обзор-дискуссия)

А. М. Голубев*

НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского
Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии,
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

Для цитирования: А. М. Голубев. Енолазы: ограничения внедрения в клиническую практику (обзор-дискуссия). *Общая реаниматология*. 2024; 20 (3): 53–64. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2024-3-xx> [На русск. и англ.]

*Адрес для корреспонденции: Голубев Аркадий Михайлович, arkadygolubev@mail.ru

Резюме

Енолазы участвуют в утилизации глюкозы (путь Эмбдена–Мейергофа2-Парнаса), имеющего исключительно важное значение в обеспечении клеток энергией в условиях гипоксии при критических состояниях. Енолазы привлекают внимание в связи с возможностью их использования в качестве диагностического маркера при критических состояниях.

Цель обзора: анализ причин, ограничивающих клиническое применение енолаз в диагностических и прогностических целях при критических состояниях.

Критерием отбора 87 публикаций из баз данных PubMed и eLibrary являлись предложения авторов и официальные рекомендации по клиническому применению енолаз в диагностических и прогностических целях.

Рассмотрели характеристику молекулярных форм енолаз, клинические аспекты и рекомендации клинического применения енолаз, методологические и методические ошибки при их исследовании. Выделили следующие дискуссионные вопросы: определение концентрации енолаз не отражает ферментативную активность их множественных молекулярных форм; выявление молекулярных форм енолаз с помощью антител к структурной субъединице не позволяет оценить истинное содержание и ферментативную активность каждой молекулярной формы (например, γ - и $\alpha\gamma$ -енолазы); представление о том, что гетеродимеры являются клеточноспецифическими (в частности, нейронспецифическая $\alpha\gamma$ -енолаза) не подтверждается имеющимися исследованиями, поскольку данный изофермент обнаруживается в клетках различных органов; не учитывается ряд методических условий (скрытый гемолиз, отсутствие унифицированных методов исследования и т. д.).

Закключение. Исследования, которые будут выполняться на методологической платформе с применением методов, позволяющих оценивать содержание и ферментативную активность каждой молекулярной формы енолазы, позволят получить новую информацию в рамках персонализированной медицины о роли конкретных молекулярных форм енолазы в патогенезе заболеваний и оценить их диагностическое и прогностическое значение, а также эффективность лечебных мероприятий.

Ключевые слова: енолазы; изоферменты; множественные молекулярные формы; критические состояния; клинические рекомендации

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Enolases: Limitations for Implementation in Clinical Practice (Critical Review)

Arkady M. Golubev*

V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,
25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

Summary

Enolases (ENOs) are involved in glycolysis, which is critical for providing energy to cells under hypoxic conditions. ENOs are attracting the attention of researchers as a potential diagnostic marker for critical conditions.

The aim of this review is to analyze the reasons limiting the clinical use of ENOs for diagnostic and prognostic purposes in critical conditions.

We selected and analyzed 87 publications in which ENOs assessment was mainly performed in patients with critical illness. Criteria for selecting relevant publications from PubMed and Elibrary were based on a presence of authors' recommendations or current guidelines on clinical use of ENOs for diagnostic or prognostic purposes.

Specific properties of human ENO isoenzymes were reviewed, clinical aspects and recommendations for their clinical use, as well as methodological and procedural errors in ENO testing were considered.

The following controversial issues were identified: the measured level of ENOs does not characterize the true enzymatic activity of their numerous molecular isoforms; identification of specific ENO isoforms using

antibodies to structural subunits does not allow assessment of the true content and enzymatic activity of potentially circulating isoenzymes (e.g., gamma-gamma and alpha-gamma ENOs); the concept of cell specificity ascribed to heterodimers (in particular, gamma-alpha enolase is considered to be neuron-specific) is not supported by the results of the available studies, since this heterodimeric form of ENO is present in a variety of human tissues; some procedural issues are not taken into account (e.g., latent hemolysis, lack of standardized assessment methods, etc.).

Conclusion. The use of advanced diagnostic platforms based on the assessment of the content and enzymatic activity of each ENO isoform should provide valuable information on their specific role in the pathogenesis of diseases in the context of personalized medicine and will enable the evaluation of their diagnostic and prognostic significance, as well as the effectiveness of therapeutic interventions.

Keywords: *enolases; isoenzymes; multiple molecular forms; critical conditions; clinical guidelines*

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

Read the full-text English version at www.reanimatology.com

Введение

Различные заболевания, травмы, при которых развиваются критические состояния, характеризуются тяжелыми нарушениями метаболизма, в связи с чем исследование молекулярных биомаркеров имеет важное значение для диагностики, контроля лечения, прогноза исхода заболевания [1–7].

Перспективными молекулярными биомаркерами являются енолазы. Активное изучение енолаз обусловлено открытием гликолиза — одного из главных механизмов окисления глюкозы (путь Эмбдена–Мейергофа–Парнаса). В его основе лежит фосфорилирование глюкозы с образованием пировиноградной кислоты (пирувата). Реакции гликолиза, сопровождающиеся образованием энергии в форме АТФ, а также НАДН, обеспечивающие энергетическую основу для клеточного метаболизма были открыты к 1940 г.

Енолаза была открыта в начале 30-х гг. XX в. Мейергофом и Ломаном в процессе исследования гликолиза [8]. Фосфопируватгидратаза, также известная как 2-фосфо-D-глицератгидролаза (ЕС 4.2.1.11), и обычно называемая енолаза, является важнейшим катаболическим ферментом, превращающим 2-фосфоглицерат в фосфоенолпируват в гликолитическом пути для производства АТФ [9].

В условиях нормоксии ферменты гликолиза диффузно распределены в цитоплазме клеток. Недавние исследования выявили эффект компартментализации ферментов гликолиза в ответ на гипоксический стресс. Концентрация ферментов гликолиза повышает скорость утилизации глюкозы в целях увеличения производства энергии. Нарушение компартментализации может приводить к нарушению метаболизма (в том числе в нейронах). Гипоксия ингибирует цикл трикарбоновых кислот и в этих условиях гликолиз является основным метаболическим путем, ответственным за превращение глюкозы в полезную энергию. Однако механизмы, компенсирующие потерю выработки энергии в результате инактивации цикла трикарбоновых кислот, остаются недостаточно изученными [10].

Актуальность изучения гликолиза в медицинской практике с целью использования ферментов в диагностике заболеваний несомненна. В этом плане енолаза привлекает внимание в связи с возможностью ее использования в качестве диагностического маркера при критических состояниях.

Цель обзора — анализ причин, ограничивающих клиническое применение енолаз в диагностических и прогностических целях при критических состояниях.

Провели анализ более 500 источников литературы, посвященных исследованию енолаз. Критерием отбора 87 публикаций из баз данных PubMed и elibrary явились предложения авторов по применению результатов исследования енолаз в диагностических целях и официальные рекомендации по применению енолаз в клинике.

В дискуссионном обзоре рассмотрели характеристику молекулярных форм енолаз, клинические аспекты и рекомендации их клинического применения, методологические и методические ошибки при исследовании енолаз.

Ограничения исследований по теме обзора: преимущественно использовали публикации, касающиеся изучения енолаз при критических состояниях.

Молекулярные формы енолаз

Енолазы являются одними из наиболее распространенных и экспрессируемых белков с высокосохраненной аминокислотной последовательностью в клетках организмов — от архей до млекопитающих [11]. S. M. Seki и A. Gaultier показали, что енолаза играет доминирующую роль в метаболизме при воспалении, а также при гипоксии путем активизации гликолиза [12].

Семейство енолаз представлено множественными молекулярными формами ферментов (ММФФ) — группой белков-металлоферментов, выполняющих идентичную каталитическую функцию, отличающихся по структуре и ряду физико-химических свойств.

Разнообразие ММФФ имеет определенное биологическое значение. При изменении условий существования спектр ММФФ в клетке мо-

жет меняться, в результате чего организм эффективнее приспосабливается к внешним условиям. Изменения соотношения ММФФ (их число, активность каждой из форм, стабильность) являются одним из механизмов регуляции обменных процессов.

Среди ММФФ енолаз выделяют генетически детерминированные формы, их принято называть изоферментами или изоэнзимами (отличаются друг от друга первичной структурой белка), и формы, возникшие в результате эпигенетических изменений.

Все молекулярные формы енолаз локализуются преимущественно в цитозоле клеток. Точная локализация енолаз обеспечивается короткими вариабельными участками в их структуре, которые играют роль контактов с элементами цитоскелета.

Изоферменты енолазы представлены гомо- и гетеродимерами, образованными при комбинации трех субъединиц: α , β и γ .

Гомодимеры состоят из 2 идентичных субъединиц к ним относятся:

енолаза 1 (ЕНО 1) или α -енолаза — образована двумя α -субъединицами ($\alpha\alpha$);

енолаза 2 (ЕНО 2) или γ -енолаза (называемая также нейрон-специфической енолазой, НСЕ) — образована двумя γ -субъединицами ($\gamma\gamma$);

енолаза 3 (ЕНО 3) или β -енолаза — образована двумя β -субъединицами ($\beta\beta$).

К гетеродимерам относятся $\alpha\gamma$ (изофермент НСЕ) и $\beta\gamma$ изоформы.

Еще один изофермент енолазы — ЕНО S, был обнаружен в сперматозоидах человека, баранов и мышей. Этот изофермент уникален для сперматозоидов и отличается от соматических енолаз ЕНО 1, ЕНО 2 и ЕНО 3 электрофоретической подвижностью, высокой термостабильностью и способностью подвергаться структурным изменениям при высоких температурах. Он получил название енолаза 4 (ЕНО 4) [13].

Исследование экспрессии ЕНО-S при дифференцировке сперматозоидов позволяет предположить, что этот изофермент синтезируется относительно поздно при гаплоидном геноме [14].

Все возможные димеры, кроме $\beta\gamma$, выявлены *in vivo*. Молекулярная масса енолаз колеблется от 82 до 100 kD [15].

Субъединицы α , β и γ экспрессируются разными генами: ген *ENO1* кодирует α -енолазу, ген *ENO2* — γ -енолазу и ген *ENO3* — β -енолазу. Их экспрессия изменяется во время развития, метаболических или общепатологических процессов [16].

Для поддержания структурной стабильности и каталитической активности енолазы необходимы ионы двухвалентных металлов, особенно Mg^{2+} . Активный центр енолазы, в ко-

тором ионы металлического магния действуют как кофакторы, связывается с субстратом: 2-фосфоглицератом. Такой же эффект проявляют и ионы Zn^{2+} . Фторид действует как ингибитор енолаз [17]. Кроме ферментативной, молекулярные формы енолаз имеют неферментативные функции.

Биологическая роль и клинические аспекты применения енолаз

Условием оптимального использования биомаркера в медицинской практике является его высокая специфичность и чувствительность, а также быстрота и экономическая эффективность метода его определения [18].

Альфа-енолаза. Альфа-енолаза участвует в синтезе пирувата, действует как рецептор плазминогена и опосредует активацию плазмина и деградацию внеклеточного матрикса. Альфа-енолаза экспрессируется на поверхности нескольких типов клеток, способствуя опухолевой инвазии.

Установлено, что α -енолаза экспрессируется на клеточной поверхности дифференцирующихся миоцитов и ингибиторы связывания α -енолазы/плазминогена блокируют регенерацию скелетных мышц [19].

Обнаружено, что ассоциация α -енолазы с мембраной митохондрий важна для стабильности митохондриальной мембраны, а ее секвестрация на поверхности клетки имеет решающее значение для опосредованного плазмином периклеточного протеолиза [20].

Начиная с эмбрионального периода α -енолаза продолжает экспрессироваться в большинстве тканей взрослого человека. Переход к специфическим изоформам енолазы происходит во время онтогенеза в двух типах клеток с высокими энергетическими потребностями: $\alpha\gamma$ - и γ -енолазы выявляются в нейронах, $\alpha\beta$ - и β -енолазы — в поперечно-полосатых мышечных клетках [21].

Содержание α -енолазы в эмбриональном мозге высокое и уменьшается с созреванием нейронов [22]. В процессе дифференцировки головного мозга α -енолаза замещается в нейронах γ -енолазой, что является поздним событием в развитии нервной системы и может быть маркером зрелости нейронов [23].

Гиперэкспрессия α -енолазы и ее посттрансляционные модификации (ацетилирование, метилирование и фосфорилирование) могут иметь диагностическое и прогностическое значение при многих типах рака. Способность α -енолазы вызывать сильный специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ делает этот

белок перспективной мишенью для лечения опухолей [24, 25].

Гиперэкспрессия α -енолазы человека была зарегистрирована при широком спектре раковых заболеваний и тесно связана с плохим прогнозом, что делает ее не только терапевтической мишенью, но и актуальным биомаркером [26].

Обнаружено, что α -енолаза гиперэкспрессируется в клетках меланомы кожи. Гиперэкспрессия α -енолазы способствовала инвазии, миграции и пролиферации опухолевых клеток; при этом отмечалась повышенная выработка пирувата и лактата. Противоположные эффекты наблюдались в клетках меланомы, в которых α -енолаза была инактивирована. Таким образом, α -енолаза представляет собой потенциальную терапевтическую мишень при меланоме кожи [27].

Альфа-енолаза способствует пролиферации клеток рака поджелудочной железы. Нокаут экспрессии α -енолазы подавлял способность к пролиферации и образованию колоний клеток опухолей. Результаты исследования показали, что α -енолаза является онкогенным биомаркером и может служить перспективной мишенью для иммунотерапии при раке поджелудочной железы [28].

Изучена роль α -енолазы в пролиферации, инвазии и апоптозе клеток рака молочной железы человека. Результаты исследования показали, что α -енолаза может быть потенциальной терапевтической мишенью при раке молочной железы [29]. Подавление ее экспрессии снижает пролиферативную активность, инвазионную способность и скорость апоптоза клеток рака молочной железы.

Обнаружено, что α -енолаза взаимодействует с β -амилоидом (A β) и ингибирует его фибриллообразование [30]. Разрушение фибрилл A β и ослабление цитотоксических эффектов этих фибрилл осуществляется посредством протеолитической деградации пептида A β . Инфузия α -енолазы в мозг мышей APP23 уменьшала цереброваскулярные отложения A β и снижала когнитивные нарушения.

Ферментативно инактивированная α -енолаза не способна ингибировать образование и разрушение фибрилл A β . Таким образом, протеолитическая активность α -енолазы может лежать в основе цитопротекторного эффекта фермента и выведения A β из мозга, и α -енолаза может быть терапевтической мишенью при церебральной амилоидной ангиопатии [30].

Некоторые из неметаболических функций α -енолазы влияют на цикл репликации вируса в инфицированных клетках, что стимулирует исследования по применению α -енолазы в качестве мишени при лечении вирусных заболеваний [31].

Гамма-енолаза. Гамма-енолаза (называемая вместе с α -енолазой также НСЕ) привлекает внимание исследователей и клиницистов, поскольку она является, как считают, специфическим маркером нейронов [18].

В нейронах и клетках нейроэндокринной системы γ -енолаза специфично ассоциирована с плазматической мембраной.

НСЕ участвует в аксональном транспорте, и уровень ее экспрессии может колебаться в зависимости от потребности энергии в клетке. Когда аксоны повреждены, содержание НСЕ возрастает. Иммуногистохимическое выявление НСЕ избирательно маркирует поврежденные аксоны в мозолистом теле при диффузном аксональном повреждении, в то время как в неповрежденных аксонах НСЕ не обнаруживается [32].

Отмечается, что сывороточные концентрации НСЕ у пациентов с ишемическим инсультом повышены по сравнению с контрольной группой и коррелируют с размером инфаркта и неврологическим дефицитом [33, 34]. Пациенты, у которых был зарегистрирован второй пик повышенного содержания НСЕ в сыворотке (20% исследуемой популяции) в отсроченном периоде ишемического инсульта, были более подвержены риску развития геморрагической трансформации [35].

Показатель НСЕ менее 2 нг/мл в остром периоде заболевания является предиктором хорошего функционального исхода через 12–14 дней от начала инсульта. Содержание НСЕ > 2,6 нг/мл связано с высокой вероятностью летального исхода [36]. Как у молодых, так и у пожилых пациентов с ишемическим инсультом, состояние которых улучшилось, содержание НСЕ либо оставалось стабильным, либо снижалось на момент выписки. В то же время содержание НСЕ возрастало у пациентов с неблагоприятным исходом [37].

Содержание НСЕ в сыворотке крови является индикатором повреждения нейронов и помогает в прогнозировании инвалидности и клинического исхода у пациентов с гипертонической болезнью и ишемическим инсультом [38]. Предложено использовать показатели сывороточной НСЕ в качестве биохимического маркера повреждения при ишемии-реперфузии головного мозга после эндартерэктомии сонных артерий [39].

Выявление НСЕ в периферической крови может предоставить ценную и своевременную диагностическую информацию об инсульте, особенно когда невозможно определить время начала инсульта [40]. С учетом корреляции между содержанием НСЕ в сыворотке крови и размером инфаркта мозга, НСЕ может быть предиктором тяжелых клинических проявлений

острого ишемического инсульта [41]. Высокое исходное содержание НСЕ связано с плохими исходами ишемического инсульта в течение 1 года у пациентов с гипертензией [42].

Сообщается, что у пациентов с внебольничной остановкой сердца, которым проводилось управление температурой тела с неблагоприятными неврологическими исходами, содержание НСЕ в сыворотке крови при выраженных нарушениях гематоэнцефалического барьера было выше, чем без него [43].

Сочетание определения содержания НСЕ и нейровизуализации улучшает прогнозирование исхода после остановки сердца с целевым управлением температурой тела [44]. У 171 из 475 пациентов (36%) было зарегистрировано прекращение сердечной деятельности, причем при невысоком содержании НСЕ через 6 мес. были хорошие неврологические исходы, а при повышенном содержании НСЕ — неудовлетворительные [45].

Отмечается, что высокое содержание НСЕ в спинномозговой жидкости является предиктором плохого неврологического исхода у выживших после внебольничной остановки сердца [46]. У невыживших пациентов с внебольничной остановкой сердца содержание НСЕ в сыворотке крови возрастало в течение первых 72 ч, а у выживших — содержание НСЕ снижалось через 48 ч [47].

Возрастание содержания НСЕ в сыворотке крови отмечено при туберкулезе, хронической обструктивной болезни легких, альвеолярном протеинозе, остром респираторном дистресс-синдроме [15]. Повышенная концентрация НСЕ отмечена в сыворотке крови пациентов с силикозом, что имеет значение для диагностики и оценки тяжести заболевания [48].

У пациентов с одышкой, инфицированных SARS-CoV-2, содержание НСЕ в сыворотке крови выше, чем у пациентов с более легким течением и в группе контроля [49].

Повышенное содержание НСЕ в сыворотке крови отмечено у больных мелкоклеточным раком легких [50]. Показано, что модуляция НСЕ регулирует пролиферацию клеток, устойчивость к лекарственным средствам, рост опухоли [51].

Предполагается, что НСЕ может быть кандидатным биомаркером прогноза рака желудка [52]. Однако в последнее время все чаще появляются публикации, демонстрирующие результаты, не подтверждающие клиническую эффективность контроля енолаз (прежде всего НСЕ).

В связи с трудностью интерпретации результатов исследования НСЕ в качестве метода количественной оценки изменений ее содер-

жания был предложен коэффициент, устраняющий необходимость оценки абсолютных значений НСЕ. Значения коэффициента выше 1,0 указывают на увеличение содержания НСЕ и могут свидетельствовать о продолжающемся повреждении нейронов [53].

Однако исследование А. Nuṭanu и соавт. [54] ставит под сомнение использование НСЕ в качестве маркера ишемического инсульта. В данном исследовании не выявлено значимых различий между содержанием НСЕ в сыворотке крови пациентов с ишемическим инсультом и контрольной группой, а высокое содержание НСЕ было ассоциировано с благоприятным исходом. Кроме того, содержание НСЕ не было связано с функциональным исходом заболевания через 3 месяца.

Об отсутствии связи содержания НСЕ с функциональным исходом, а также с тяжестью инсульта свидетельствуют результаты систематического обзора [55]. Выявлено, что показатель НСЕ не позволяет дифференцировать ишемический и геморрагический тип инсульта [56].

Противоречивые результаты получены в отношении информативности показателей НСЕ в отсроченном периоде ишемического инсульта после эндоваскулярного лечения. Образцы крови были взяты у 90 пациентов до эндоваскулярного лечения и через 2 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч и 3 мес. после него. Содержание НСЕ в сыворотке крови оставалось постоянным в течение всего периода исследования [57].

Интересные результаты на основании клинических и экспериментальных данных получены в исследовании Л. Е. Pelinka и соавт. [58], направленном на решение вопроса о том, является ли НСЕ информативным ранним маркером черепно-мозговой травмы (ЧМТ) и влияет ли НСЕ на ишемическое/реперфузионное повреждение органов брюшной полости. Показано, что содержание сывороточной НСЕ увеличивается в одинаковой степени как у пациентов с ЧМТ, так и у пациентов с политравмой, но без ЧМТ.

У крыс концентрация НСЕ в сыворотке крови увеличивалась более чем в 3 раза по сравнению с лабораторным контролем во время ишемии печени и почек, более чем в 2–3 раза после реперфузии печени, почек и кишечника. Таким образом, не подтвердилась гипотеза о том, что НСЕ является ранним маркером ЧМТ при множественной травме [58].

Бета-енолаза. Бета-енолаза присутствует в скелетной и сердечной мышцах [21, 59]. Высокое содержание субъединиц β-енолазы характерно в быстро сокращающихся волокнах мышц взрослого человека [60]. Бета-енолаза является маркером мышечной дифференцировки при рабдомиосаркоме [61].

Мутации гена *ENO3*, продуцирующего β -субъединицу енолазы, приводят к снижению стабильности мутантной β -енолазы [62]. Содержание β -енолазы в сыворотке крови является индикатором мышечного повреждения, вызванного физической нагрузкой у спортсменов [63].

Дефицит мышечной β -енолазы является очень редкой наследственной метаболической миопатией. В исследовании у двух мужчин, итальянца и турка, чьи родители были кровными родственниками, отметили жалобы на несколько эпизодов интенсивной миалгии, судорог, генерализованной мышечной болезненности и темной мочи. Никто из других членов семьи не сообщал о подобных симптомах. Биохимические исследования мышечной ткани показали выраженное снижение активности мышечной β -енолазы (20 и 10% остаточной активности соответственно). Молекулярно-генетический анализ гена *ENO3* выявил две гомозиготные миссенс-мутации [64].

Иммуноцитохимический анализ поперечных срезов икроножной мышцы взрослой мыши позволил сравнить экспрессию α - и β -субъединиц с экспрессией изоформ тяжелой цепи миозина. Экспрессия β -енолазы в мышечных клетках тонко регулируется в зависимости от энергетических потребностей. Интенсивность экспрессии α -енолазы оказалась независимой от типов волокон. Анализ конфокальной микроскопии показал, что α -енолаза локализована в М-диапазоне. Большая часть β -енолазы распределялась по всей саркоплазме. Некоторая часть β -енолазы локализовалась как в Z, так и в М-диапазонах. Результаты исследования подтверждают идею о том, что изоферменты различаются по своей способности взаимодействовать с другими макромолекулами, разделяясь на различные субклеточные участки, где они реагируют на определенные функциональные потребности [65].

ЕНО-S (сперматозоид-специфическая енолаза). Изофермент ЕНО-S исследован в сперматозоидах на разных стадиях их созревания. Методом электрофореза показано, что в сперматозоидах яйцек ЕНО-S присутствовала в 2 основных полосах, названных S1 и S3. При анализе ЕНО-S в сперматозоидах придатка яичка визуализировали полосы S1, S3 и дополнительную полосу S2, которые обладали теми же электрофоретическими свойствами, что ЕНО-S из эякулированного сперматозоида.

В экстрактах яйцек, в которых сперматозоиды не визуализировались при гистологическом анализе, не было обнаружено ни одной из 3 полос ЕНО-S. Таким образом, ЕНО-S существует в виде различных изоформ (электрофоретических вариантов) на разных стадиях со-

зревания сперматозоидов. Проход через придаток яичка, по-видимому, играет важную роль в процессе созревания ЕНО-S [66].

ЕНО-S и α -енолаза. Активность ЕНО-S и α -енолазы сперматозоидов 30 нормоспермальных фертильных мужчин и 20 пациентов с абнормоспермическим бесплодием была измерена суммарно. Общая активность енолазы была значимо выше в общей сперме пациентов с абнормоспермией по сравнению с нормоспермическими пациентами. Активность α -енолазы в общем количестве сперматозоидов у абнормоспермических мужчин была значительно выше, чем у нормоспермических. Активность α -енолазы положительно коррелировала с процентом незрелых сперматозоидов, демонстрирующих избыток остаточной цитоплазмы. Активность ЕНО-S в общей сперме нормоспермических пациентов была значимо выше, чем у абнормоспермических пациентов. Исследованные изоформы енолазы, по-видимому, отражают противоположные аспекты качества сперматозоидов: α -енолаза связана с аномальными, а ЕНО-S — с нормальными сперматозоидами. В качестве дополнительного показателя, позволяющего отличить нормальную сперму от аномальной, в обеих группах оценивали соотношение ЕНО-S : α -енолаза. Это соотношение является маркером качества спермы и представляет прогностический индекс потенциала оплодотворения яйцеклеток сперматозоидами [67].

Сочетание гетеро- и гомодимерных форм енолаз. Большая часть енолазы тромбоцитов и эритроцитов представлена гетеродимером $\alpha\gamma$ в сочетании с гомодимером α -енолазы [68, 69].

В изолированных гибридных клеточных линиях были получены два моноклональных антитела к γ -енолазе человека и крупного рогатого скота. Они демонстрировали реакционную способность с γ - и $\alpha\gamma$ -изоформами енолазы человека и крысы, а также с γ -енолазой крупного рогатого скота. Антитела не вступали в перекрестную реакцию с α - или β -субъединицей изоферментов енолазы человека и крысы. Оба антитела частично ингибировали активность γ - и $\alpha\gamma$ -енолазы [70].

С помощью иммуноферментной системы определяли распределение 3-х форм енолазы крыс (α -, $\alpha\gamma$ - и γ -), в том числе специфических для нервной системы ($\alpha\gamma$ - и γ -енолазы). В головном и спинном мозге содержалось более 100 пмоль/мг α -, $\alpha\gamma$ и γ -енолазы. Такие органы, как легкие, сердце, селезенка, печень и почки имели столь же высокое содержание α -енолазы, но содержание $\alpha\gamma$ - и γ -енолазы составляло менее 1% от их концентрации в центральной нервной системе. Высокие концентрации $\alpha\gamma$ - (более 10 пмоль/мг) и γ -енолазы (более 1,5 пмоль/мг)

были обнаружены в прямой кишке, мочевом пузыре и матке [71].

Гамма- и α -изоформы относят к нейрон-специфической енолазе (NSE). NSE преимущественно обнаруживается в нейронах и нейроэндокринных клетках и является маркером опухолей, происходящих из этих клеток. Он используется при наблюдении за пациентами с мелко-клеточным раком легкого. В последнее время применяется для мониторинга повреждений головного мозга. Моноклональные антитела к γ -енолазе были получены на мышах и использовались в системе иммуноферментного анализа Cobas Core, который является быстрым, надежным и удобным тестом для измерения содержания NSE в сыворотке крови человека [72].

Новые клинические требования к сортировке пациентов с болью в грудной клетке бросают вызов возможностям существующих кардиологических маркеров. Серийные измерения массы изоформентов креатинкиназы, форм тропонина, а также миоглобина в отделениях неотложной помощи помогают быстро исключить острый инфаркт миокарда (ОИМ). Однако в течение первых 3–4 ч от начала боли в груди их чувствительность недостаточно высокая, чтобы внести существенный вклад в диагностику ОИМ. Предложенные молекулярные маркеры для ранней диагностики ОИМ включают изоформу енолазы $\alpha\beta$ [73].

Рекомендации клинического применения енолаз

Американская академия неврологии рекомендовала использование сывороточной NSE для прогноза неблагоприятного исхода после глобальной церебральной гипоперфузии у пациентов, нуждающихся в сердечно-легочной реанимации. Однако ограниченная доступность задержала общее применение этого теста для принятия клинических решений после глобальной церебральной гипоперфузии [74].

Было проведено исследование по определению содержания NSE для неврологического прогноза через 24, 48 и 72 ч после возвращения спонтанного кровообращения (Return Of Spontaneous Circulation, ROSC) в когорте пациентов с внебольничной остановкой сердца с целью подтверждения ранее предложенных предельных значений, включая рекомендации ERC — 2021. (ERC guidelines 2021). Результаты исследований содержания в сыворотке крови NSE с целью прогнозирования неблагоприятного неврологического исхода в долгосрочной перспективе после внебольничной остановки сердца показали более высокие пороговые значения NSE, чем предполагалось в предыдущих публикациях [75].

Проведено также проспективное исследование по изучению прогностической эффективности автоматизированной количественной пупиллометрии у пациентов, находящихся в бессознательном состоянии, реанимированных после остановки сердца. Предполагается, что валидация пупиллометрии в сочетании с критерием NSE > 60 мкг/л повысит уровень доказательности клинического прогноза [76].

Не получено убедительных данных по использованию NSE в других областях практической медицины (онкология, педиатрия).

Отсутствуют доказательства, подтверждающие использование сывороточной NSE для диагностики и мониторинга нейробластомы. Высокий риск получения ложноположительных результатов, связанных с сопутствующими факторами (например, гемолиз образца) и другими состояниями (например, воспалением), что значительно снижает диагностическую ценность этого теста [77].

Существует ряд ограничений, которые не позволяют включать биомаркеры в стандартную процедуру мониторинга в педиатрии. Основными ограничениями являются: неоднородность неврологических осложнений, небольшие размеры когорты, отсутствие многоцентровых исследований, использование различных методов оценки нейробиомаркеров, отсутствие консенсуса в отношении валидации анализов биологических жидкостей, отсутствие эталонных оценок в соответствии с техникой измерения содержания молекулярного маркера в биологических жидкостях [78].

Тем не менее исследования возможности применения енолаз в клинической практике продолжаются. В результате картирования специфических эпитопов было отобрано 32 наиболее вероятных эпитопа для енолазы [79].

Выявлено несколько эпитопов NSE, специфичных для аутизма, как у матерей, так и новорожденных детей, которые могут быть использованы в качестве биомаркеров данного заболевания [80].

Методологические и методические ошибки при исследовании енолаз

Несмотря на многолетние исследования маркеров повреждения головного мозга, их применение для диагностики, мониторинга и прогнозирования исхода при инсультах не внедрено в клиническую практику [81]. На начальных этапах эти исследования базировались на использовании биохимических методов (выделение молекулярных форм на колонках, электрофоретически и др.).

В 1960-е гг. прошлого столетия был предложен метод иммуноферментного анализа (ИФА),

который стал широко использоваться в 70–80-е гг. Это привело к тому, что ИФА постепенно вытеснил классические биохимические методы исследования, что, на наш взгляд, было серьезной методологической ошибкой. ИФА — высокочувствительный метод. В то же время его высокая восприимчивость к помехам зачастую лежит в основе ошибок, которые ведут к неправильным заключениям и последующим ошибочным практическим решениям [82].

Обычные иммунологические анализы не могут дифференцировать изоферменты [83, 84]. Анализ отдельных молекулярных форм енолаз был практически прекращен. Клиническая применимость количественного определения НСЕ с использованием традиционных сэндвич-иммуноанализов затруднена отсутствием соответствия между анализами и ложно повышенными концентрациями, вызванными гемолизом [85].

Одной из ошибок является суммарное количественное выявление гомо- и гетеродимерных форм γ - и α -изоформ енолазы.

Объединение этих двух изоферментов в качестве «нейронспецифической енолазы» является принципиально неверной позицией, поскольку изоферменты γ -енолазы и α -енолазы имеют различную структуру, продуцируются различными клетками и, вероятно, различаются функциональными свойствами. В связи с этим, результаты различных исследований НСЕ на основе ИФА при острых нарушениях мозгового кровообращения крайне противоречивы.

Не исключено, что α -енолаза может сочетать свойства α и γ субъединиц, но могут проявляться свойства, отличающие ее от гомодимерных форм γ - и α -енолазы. Поэтому, для исследования различных молекулярных форм енолазы разрабатывают аналитические методы, которые предусматривают подготовку образцов путем иммуноэкстракции всех молекулярных форм НСЕ [86, 84].

Наиболее существенным различием между α -енолазой и γ -енолазой является чувствительность к ионам хлорида, мочеvine и температуре. Альфа-енолаза очень чувствительна к ионам хлорида, мочеvine и температуре. Напротив, γ -енолаза значительно более стабильна при хлорид-индуцированной инактивации. Относительная нечувствительность γ -енолазы к ионам хлорида особенно интересна, поскольку ионы хлорида накапливаются в нервных клетках во время повторной деполяризации. Относительная устойчивость γ -енолазы к ионам хлорида, возможно, эволюционировала, чтобы адаптироваться к внутриклеточной среде нейронов, тем самым предотвращая инактивацию хлор-чувствительной енолазы в нейронах, когда метаболическая энергия наиболее необходима [84, 15].

Гетеродимер $\alpha\gamma$ предложено анализировать с использованием антитела к одной субъединице в виде твердофазного, и антитела к другой субъединице в виде меченого комплекса [87].

Большое значение имеет стандартизация методов исследования, включающая использование реактивов одной фирмы, однотипных приборов для оценки результатов исследования, соблюдение принятого варианта исследования биологических образцов (пробоподготовка, исключение перекрестных реакций и т. д.)

Существенной методологической ошибкой явилось прекращение определения ферментативной активности енолаз. Дело в том, что енолаза — не просто белок, а белок-фермент гликолиза, который в условиях гипоксии обеспечивает продукцию энергии, оказывая цитопротекторный эффект.

Заключение

Исследование множественных молекулярных форм енолаз является актуальным направлением в реаниматологии. Это обусловлено исключительной ролью гликолиза в метаболизме различных органов и систем при критических состояниях. При планировании научных исследований в данном направлении представляется важным учитывать следующие положения.

Во-первых, необходимым условием является определение ферментативной активности енолаз в целом и каждой исследуемой молекулярной формы.

Во-вторых, антитела, полученные к молекулярным формам енолаз, маркируют ту или иную субъединицу белка (α , γ или β), поэтому антитела, полученные, например, к γ субъединице, будут выявлять как γ -енолазу, так и $\alpha\gamma$ -енолазу. Безусловно, совместное выявление двух молекулярных форм енолазы не позволяет оценить истинное содержание и ферментативную активность каждой молекулярной формы. Решением этого вопроса является разделение енолаз на отдельные молекулярные формы, которые могут исследоваться индивидуально.

Представление о том, что гетеродимеры являются клеточно-специфическими изоферментами не подтверждается исследованиями, обнаруживающими их в клетках различных органов. Это, безусловно, препятствует персонализированной оценке изменений молекулярных форм енолаз при различных заболеваниях (в том числе — критических состояниях).

Исследования на новой методологической платформе с применением методов оценки содержания и ферментативной активности каждой молекулярной формы енолазы позволят получить информацию о роли конкретных изо-

ферментов в патогенезе заболеваний, оценить их диагностическое и прогностическое значение,

а также эффективность лечебных мероприятий в рамках персонализированной медицины.

Литература

1. Atkinson A.J., Colburn W.A., DeGruttola A.G., DeMets D.L., Downing G.J., Hoth J.F., Colburn W.A., et al. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69 (3): 89–95. DOI: 10.1067/mcp.2001.113989. PMID: 11240971.
2. Kamtchum-Tatuene J., Jickling G.C. Blood biomarkers for stroke diagnosis and management. *Neuromolecular Med.* 2019; 21 (4): 344–368. DOI: 10.1007/s12017-019-08530-0. PMID: 30830566.
3. Голубев А.М. Персонализированная медицина критических состояний (обзор). *Общая реаниматология.* 2022; 18 (4): 45–54. Golubev A.M. Personalized critical care medicine (Review). *General Reanimatology=Obshchaya Reanimatologiya.* 2022; 18 (4): 45–54. (in Russ.&Eng.). DOI: 10.15360/1813-9779-2022-4-45-54.
4. Голубев А.М., Гречко А.В., Захарченко В.Е., Канарский М.М., Петрова М.В., Борисов И.В. Сравнительная характеристика содержания кандидатных молекулярных маркеров при ишемическом и геморрагическом инсульте. *Общая реаниматология.* 2021; 17 (5): 23–34. Golubev A.M., Grechko A.V., Zakharchenko V.E., Kanarsky M.M., Petrova M.V., Borisov I.V. Comparative characterization of candidate molecular markers in ischemic and hemorrhagic stroke. *General Reanimatology=Obshchaya Reanimatologiya.* 2021; 17 (5): 23–34. (in Russ.&Eng.). DOI: 10.15360/1813-9779-2021-5-23-34.
5. Тынтерова А.М., Моисеева Е.М., Голубев А.М., Шушарина Н.Н. Роль эндотелинергических и нитроксидагических реакций в прогнозировании функционального исхода пациентов с различной степенью тяжести ишемического инсульта. *Общая реаниматология.* 2023; 19 (5): 13–20. Tynterova A.M., Moiseeva E.M., Golubev A.M., Shusharina N.N. The role of endothelinergic and nitroxidergic reactions in predicting the functional outcome in patients with ischemic stroke of different severity. *General Reanimatology=Obshchaya Reanimatologiya.* 2023; 19 (5): 13–20. (in Russ.&Eng.). DOI: 10.15360/1813-9779-2023-5-13-20.
6. Хаджиева М.Б., Грачева А.С., Еришов А.В., Чурсинова Ю.В., Степанов В.А., Авдейкина Л.С., Гребенчиков О.А., с соавт. Биомаркеры повреждения структур аэрогематического барьера при COVID-19. *Общая реаниматология.* 2021; 17 (3): 16–31. Khadzhiyeva M.B., Gracheva A.S., Ershov A.V., Chursinova Yu.V., Stepanov V.A., Avdeikina L.S., Grebenchikov O.A., et al. Biomarkers of air-blood barrier damage in COVID-19. *General Reanimatology=Obshchaya Reanimatologiya.* 2021; 17 (3): 16–31. (in Russ.&Eng.). DOI: 10.15360/1813-9779-2021-3-2-0.
7. Бабкина А.С., Голубев А.М., Острова И.В., Волков А.В., Кузовлев А.Н. Морфологические изменения головного мозга при COVID-19. *Общая реаниматология.* 2021; 17 (3): 4–15. Babkina A.S., Golubev A.M., Ostrova I.V., Volkov A.V., Kuzovlev A.N. Brain morphological changes in COVID-19. *General Reanimatology=Obshchaya Reanimatologiya.* 2021; 17 (3): 4–15. (in Russ.&Eng.). DOI: 10.15360/1813-9779-2021-3-1-0.
8. Meyerhof O., Lohmann K. Über die enzymatische Gleichgewichtsreaktion zwischen Hexosediphosphorsäure und Dioxycetonphosphorsäure. *Naturwissenschaften.* 1934; 22 (14): 220–220. DOI: 10.1007/BF01491731.
9. McALEESE S.M., Dunbar B., Fothergill J.E., Hinks L.J., Day I.N. Complete amino acid sequence of the neurone-specific γ isozyme of enolase (NSE) from human brain and comparison with the non-neuronal γ form (NNE). *Eur J Biochem.* 1988; 178 (2): 413–417. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb14465.x. PMID: 3208766.
10. Fuller G.G., Kim J.K. Compartmentalization and metabolic regulation of glycolysis. *J Cell Sci.* 2021; 134 (20): jcs.258469. DOI: 10.1242/jcs.258469. PMID: 34668544.
11. Piast M., Kustrzeba-Wójcicka I., Matusiewicz M., Banaś T. Molecular evolution of enolase. *Acta Biochim Pol.* 2005; 52 (2): 507–513. DOI: 10.18388/abp.2005.3466. PMID: 15912209.
12. Seki S.M., Gaultier A. Exploring non-metabolic functions of glycolytic enzymes in immunity. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1549. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01549. PMID: 29213268.
13. Nakamura K., Miyasho T., Nomura S., Yokota H., Nakade T. Proteome analysis of cerebrospinal fluid in healthy beagles and canine encephalitis. *J Vet Med Sci.* 2012; 74 (6): 751–756. DOI: 10.1292/jvms.11-0474. PMID: 22251802.
14. Edwards Y.H., Grootegeed J.A. A sperm-specific enolase. *J Reprod Fertil.* 1983; 68 (2): 305–310. DOI: 10.1530/jrf.0.0680305. PMID: 6864646.
15. Xu C.-M., Luo Y.-L., Li S., Li Z.-X., Jiang L., Zhang G.-X., Owusu L., et al. Multifunctional neuron-specific enolase: its role in lung diseases. *Biosci Rep.* 2019; 39 (11): BSR20192732. DOI: 10.1042/BSR20192732. PMID: 31642468.
16. Rider C.C., Taylor C.B. Enolase isoenzymes: II. Hybridization studies, developmental and phylogenetic aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Protein Structure.* 1975; 405 (1): 175–187. DOI: 10.1016/0005-2795(75)90328-1.
17. Gerlt J.A., Babbitt P.C., Rayment I. Divergent evolution in the enolase superfamily: the interplay of mechanism and specificity. *Arch Biochem Biophys.* 2005; 433 (1): 59–70. DOI: 10.1016/j.abb.2004.07.034. PMID: 15581566.
18. Jickling G.C., Sharp F.R. Blood biomarkers of ischemic stroke. *Neurotherapeutics.* 2011; 8 (3): 349–360. DOI: 10.1007/s13311-011-0050-4. PMID: 21671123.
19. Díaz-Ramos À., Roig-Borrellas A., García-Melero A., López-Alemán R. α -enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 156795. DOI: 10.1155/2012/156795. PMID: 23118496.
20. Didiasova M., Schaefer L., Wygrecka M. When place matters: shuttling of enolase-1 across cellular compartments. *Front Cell Dev Biol.* 2019; 7: 61. DOI: 10.3389/fcell.2019.00061. PMID: 31106201.
21. Merkulova T., Dehaupas M., Nevers M.C., Créminon C., Alameddine H., Keller A. Differential modulation of α , β and γ enolase isoforms in regenerating mouse skeletal muscle. *Eur J Biochem.* 2000; 267 (12): 3735–3743. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01408.x. PMID: 10848992.
22. Marangos P.J., Schmechel D., Zis A.P., Goodwin F.K. The existence and neurobiological significance of neuronal and glial forms of the glycolytic enzyme enolase. *Biol Psychiatry.* 1979; 14 (4): 563–579. PMID: 385064.
23. Marangos P.J., Schmechel D.E., Parma A.M., Goodwin F.K. Developmental profile of neuron-specific (NSE) and non-neuronal (NNE) enolase. *Brain Res.* 1980; 190 (1): 185–193. DOI: 10.1016/0006-8993(80)91168-3. PMID: 6769532.
24. Capello M., Ferri-Borgogno S., Cappello P., Novelli E. α -Enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. *FEBS J.* 2011; 278 (7): 1064–1074. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08025.x. PMID: 21261815.
25. Qiao G., Wu A., Chen X., Tian Y., Lin X. Enolase 1, a moonlighting protein, as a potential target for cancer treatment. *Int J Biol Sci.* 2021; 17 (14): 3981–3992. DOI: 10.7150/ijbs.63556. PMID: 34671213.
26. Lee C.-H., Tsai C.-H., Leu S.-J., Liu K.-J., Wang W.-C., Tsai B.-Y., Chiang L.-C., et al. Generation and characterization of avian single chain variable fragment against human Alpha-Enolase. *Int Immunopharmacol.* 2023; 120: 110277. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110277. PMID: 37196558.

27. Zhang K, Tian R, Zhang W, Li Y, Zeng N, Liang Y, Tang S. α -Enolase inhibits apoptosis and promotes cell invasion and proliferation of skin cutaneous melanoma. *Mol Biol Rep.* 2022; 49 (9): 8241–8250. DOI: 10.1007/s11033-022-07540-9. PMID: 35925486.
28. Huang C.K., Lv L., Chen H., Sun Y., Ping Y. ENO1 promotes immunosuppression and tumor growth in pancreatic cancer. *Clin Transl Oncol.* 2023; 25 (7): 2250–2264. DOI: 10.1007/s12094-023-03114-8. PMID: 36820953.
29. Zang H.-Y., Gong L.-G., Li S.-Y., Hao J.-G. Inhibition of α -enolase affects the biological activity of breast cancer cells by attenuating PI3K/Akt signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020; 24 (1): 249–257. DOI: 10.26355/eur-rev_202001_19917. PMID: 31957838.
30. Inoue Y, Tasaki M., Masuda T., Misumi Y., Nomura T., Ando Y., Ueda M. α -Enolase reduces cerebrovascular A β deposits by protecting A β amyloid formation. *Cell Mol Life Sci.* 2022; 79 (8): 462. DOI: 10.1007/s00018-022-04493-x. PMID: 35916996.
31. Vadlamani S., Karmakar R., Kumar A., Rajala M.S. Non-metabolic role of alpha-enolase in virus replication. *Mol Biol Rep.* 2023; 50 (2): 1677–1686. DOI: 10.1007/s11033-022-08067-9. PMID: 36402937.
32. Ogata M., Tsuganezawa O. Neuron-specific enolase as an effective immunohistochemical marker for injured axons after fatal brain injury. *Int J Legal Med.* 1999; 113 (1): 19–25. DOI: 10.1007/s004140050273. PMID: 10654234.
33. Dagonnier M., Donnan G.A., Davis S.M., Dewey H.M., Howells D.W. Acute stroke biomarkers: are we there yet? *Front. Neurol.* 2021; 12: 619721. DOI: 10.3389/fneur.2021.619721. PMID: 33633673.
34. Gójska-Grymajło A., Zieliński M., Wardowska A., Gąsecki D., Piśkuła M., Karaszewski B. CXCR7+ and CXCR4+ stem cells and neuron specific enolase in acute ischemic stroke patients. *Neurochem Int.* 2018; 120: 134–139. DOI: 10.1016/j.neuint.2018.08.009. PMID: 30125595.
35. Kim B.J., Kim Y.-J., Ahn S.H., Kim N.Y., Kang D.-W., Kim J.S., Kwon S.U. The second elevation of neuron-specific enolase peak after ischemic stroke is associated with hemorrhagic transformation. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2014; 23 (9): 2437–2443. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2014.05.020. PMID: 25183561.
36. Kurakina A.S., Semenova T.N., Guzanova E.V., Nesterova V.N., Schelchkova N.A., Mukhina I.V., Grigoryeva V.N. Prognostic value of investigating neuron-specific enolase in patients with ischemic stroke. *Sovrem Tekhnologii Med.* 2021; 13 (2): 68–72. DOI: 10.17691/stm2021.13.2.08. PMID: 34513079.
37. Kawle A.P., Nayak A.R., Lande N.H., Kabra D.P., Chandak N.H., Badar S.R., Raje D.V., et al. Comparative evaluation of risk factors, outcome and biomarker levels in young and old acute ischemic stroke patients. *Ann Neurosci.* 2015; 22 (2): 70–77. DOI: 10.5214/ans.0972.7531.220204. PMID: 26130910.
38. Bharosay A., Bharosay V.V., Saxena K., Varma M. Role of brain biomarker in predicting clinical outcome in hypertensive cerebrovascular ischemic stroke. *Ind J Clin Biochem.* 2018; 33 (2): 178–183. DOI: 10.1007/s12291-017-0664-3. PMID: 29651208.
39. Ilžeki J., Przywara S., Terlecki P., Grabarska A., Stepulak A., Zubilewicz T. Serum neuron-specific enolase as a marker of brain ischemia-reperfusion injury in patients undergoing carotid endarterectomy. *Acta Clin Croat.* 2016; 55 (4): 579–583. DOI: 10.20471/acc.2016.55.04.07. PMID: 29117648.
40. Glushakova O.Y., Glushakov A.V., Miller E.R., Valadka A.B., Hayes R.I. Biomarkers for acute diagnosis and management of stroke in neurointensive care units. *Brain Circ.* 2016; 2 (1): 28–47. DOI: 10.4103/2394-8108.178546. PMID: 30276272.
41. Khandare P., Saluja A., Solanki R.S., Singh R., Vani K., Garg D., Dhamija R.K. Serum S100B and NSE levels correlate with infarct size and bladder-bowel involvement among acute ischemic stroke patients. *J Neurosc Rural Pract.* 2022; 13 (2): 218–225. DOI: 10.1055/s-0042-1743214. PMID: 35694066.
42. Gao L., Xie J., Zhang H., Zheng H., Zheng W., Pang C., Cai Y., et al. Neuron-specific enolase in hypertension patients with acute ischemic stroke and its value forecasting long-term functional outcomes. *BMC Geriatr.* 2023; 23 (1): 294. DOI: 10.1186/s12877-023-03986-z. PMID: 37189072.
43. Kang C., You Y., Ahn H.J., Park J.S., Jeong W., Min J.H., In Y.N., et al. Blood-brain barrier disruption as a cause of various serum neuron-specific enolase cut-off values for neurological prognosis in cardiac arrest patients. *Sci Rep.* 2022; 12 (1): 2186. DOI: 10.1038/s41598-022-06233-4. PMID: 35140324.
44. Kim S.H., Kim H.J., Park K.N., Choi S.P., Lee B.K., Oh S.H., Jeung K.W., et al. Neuron-specific enolase and neuroimaging for prognostication after cardiac arrest treated with targeted temperature management. *PLoS ONE.* 2020; 15 (10): e0239979. DOI: 10.1371/journal.pone.0239979. PMID: 33002033.
45. Lee J.H., Kim Y.H., Lee J.H., Lee D.W., Hwang S.Y., Youn C.S., Kim J.-H., et al. Combination of neuron-specific enolase measurement and initial neurological examination for the prediction of neurological outcomes after cardiac arrest. *Sci Rep.* 2021; 11 (1): 15067. DOI: 10.1038/s41598-021-94555-0. PMID: 34302037.
46. Kang C., Jeong W., Park J.S., You Y., Min J.H., Cho Y.C., Ahn H.J. Comparison of prognostic performance between neuron-specific enolase and S100 calcium-binding protein B obtained from the cerebrospinal fluid of out-of-hospital cardiac arrest survivors who underwent targeted temperature management. *J Clin Med.* 2021; 10 (7): 1531. DOI: 10.3390/jcm10071531. PMID: 33917473.
47. Zhai Q., Feng L., Zhang H., Wu M., Wang D., Ge H., Li S., et al. Serial disseminated intravascular coagulation score with neuron specific enolase predicts the mortality of cardiac arrest—a pilot study. *J Thorac Dis.* 2020; 12 (7): 3573–3581. DOI: 10.21037/jtd-20-580. PMID: 32802436.
48. Huang H.-B., Huang J.-L., Xu X.-T., Huang K.-B., Lin Y.-J., Lin J.-B., Zhuang X.-B. Serum neuron-specific enolase: a promising biomarker of silicosis. *World J Clin Cases.* 2021; 9 (5): 1016–1025. DOI: 10.12998/wjcc.v9.i5.1016. PMID: 33644165.
49. Cione E., Siniscalchi A., Gangemi P., Cosco L., Colosimo M., Longhini F., Luciani F., et al. Neuron-specific enolase serum levels in COVID-19 are related to the severity of lung injury. *PLoS ONE.* 2021; 16 (5): e0251819. DOI: 10.1371/journal.pone.0251819. PMID: 34010310.
50. Li L., Zhang Z., Hu Y. Neuron — specific enolase predicts the prognosis in advanced small cell lung cancer patients treated with first-line PD-1/PD-L1 inhibitors. *Medicine (Baltimore).* 2021; 100 (36): e27029. DOI: 10.1097/MD.000000000027029. PMID: 34516493.
51. Lu L., Zha Z., Zhang P., Wang P., Liu X., Fang X., Weng C., et al. Neuron-specific enolase promotes stem cell-like characteristics of small-cell lung cancer by downregulating NBL1 and activating the BMP2/Smad/ID1 pathway. *Oncogenesis.* 2022; 11 (1): 21. DOI: 10.1038/s41389-022-00396-5. PMID: 35487890.
52. Park T., Lee Y.-J., Jeong S.-H., Choi S.-K., Jung E.-J., Ju Y.-T., Jeong C.-Y., et al. Overexpression of neuron-specific enolase as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *J Gastric Cancer.* 2017; 17 (3): 228–236. DOI: 10.5230/jgc.2017.17.e28. PMID: 28970953.
53. Chung-Esaki H.M., Mui G., Mlynash M., Eyngorn I., Catabay K., Hirsch K.G. The neuron specific enolase (NSE) ratio offers benefits over absolute value thresholds in post-cardiac arrest coma prognosis. *J Clin Neurosci.* 2018; 57: 99–104. DOI: 10.1016/j.jocn.2018.08.020. PMID: 30145080.
54. Huțanu A., Iancu M., Bălașa R., Maier S., Dobreanu M. Predicting functional outcome of ischemic stroke patients in

- Romania based on plasma CRP, sTNFR-1, D-Dimers, NGAL andNSE measured using a biochip array. *Acta Pharmacol Sin.* 2018; 39 (7): 1228–1236. DOI: 10.1038/aps.2018.26. PMID: 29926842.
55. Anand N., Stead L.G. Neuron-specific enolase as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *Cerebrovasc Dis.* 2005; 20 (4): 213–219. DOI: 10.1159/000087701. PMID: 16123539.
 56. Топузова М.П., Алексеева Т.М., Панина Е.Б., Вавилова Т.В., Ковзелев П.Д., Портник О.А., Скоромец А.А. Возможность использования нейрон-специфической енолазы как биомаркера в остром периоде инсульта. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2019; 119 (8–2): 53–62. Topuzova M.P., Alekseeva T.M., Panina E.B., Vavilova T.V., Kovzelev P.D., Portik O.A., Skoromets A.A. The possibility of using neuron-specific enolase as a biomarker in the acute period of stroke. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova=S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry.* 2019; 119 (8. Vyp. 2): 53–62 (in Russ.). DOI: 10.17116/jnevro201911908253. PMID: 31825363.
 57. Pujol-Calderón F., Zetterberg H., Portelius E., Hendén P.L., Rentzos A., Karlsson J.-E., Höglund K., et al. Prediction of outcome after endovascular embolectomy in anterior circulation stroke using biomarkers. *Transl Stroke Res.* 2022; 13 (1): 65–76. DOI: 10.1007/s12975-021-00905-5. PMID: 33723754.
 58. Pelinka L.E., Hertz H., Mauritz W., Harada N., Jafarmadar M., Albrecht M., Redl H., et al. Nonspecific increase of systemic neuron-specific enolase after trauma: clinical and experimental findings: *Shock.* 2005; 24 (2): 119–123. DOI: 10.1097/01.shk.0000168876.68154.43. PMID: 16044081.
 59. Nomura M., Kato K., Nagasaka A., Shiga Y., Miyagi Y., Fukui R., Nakano H. et al. Serum beta-enolase in acute myocardial infarction. *Br Heart J.* 1987; 58 (1): 29–33. DOI: 10.1136/hrt.58.1.29. PMID: 3620239.
 60. Royds J.A., Variend S., Timperley W.R., Taylor C.B. An investigation of beta enolase as a histological marker of rhabdomyosarcoma. *J Clin Pathol.* 1984; 37 (8): 905–910. DOI: 10.1136/jcp.37.8.905. PMID: 6381545.
 61. Vizin T., Kos J. Gamma-enolase: a well-known tumour marker, with a less-known role in cancer. *Radiol Oncol.* 2015; 49 (3): 217–226. DOI: 10.1515/raon-2015-0035. PMID: 26401126.
 62. Comi G.P., Fortunato F., Lucchiari S., Bordoni A., Prella A., Jann S., Keller A., et al. Beta-enolase deficiency, a new metabolic myopathy of distal glycolysis. *Ann Neurol.* 2001; 50 (2): 202–207. DOI: 10.1002/ana.1095. PMID: 11506403.
 63. Chosa E., Sekimoto T., Sonoda N., Yamamoto K., Matsuda H., Takahama K., Tajima N. Evaluation of human beta-enolase as a serum marker for exercise-induced muscle damage. *Clin J Sport Med.* 2003; 13 (4): 209–212. DOI: 10.1097/00042752-200307000-00003. PMID: 12855922.
 64. Musumeci O., Brady S., Rodolico C., Ciranni A., Montagnese F., Aguenouz M., Kirk R., et al. Recurrent rhabdomyolysis due to muscle β -enolase deficiency: very rare or underestimated? *J Neurol.* 2014; 261 (12): 2424–2428. DOI: 10.1007/s00415-014-7512-7. PMID: 25267339.
 65. Keller A., Demeurie J., Merkulova T., Géraud G., Cywiner-Golzenzer C., Lucas M., Châtelet F.P. Fibre-type distribution and subcellular localisation of alpha and beta enolase in mouse striated muscle. *Biol Cell.* 2000; 92 (7): 527–535. DOI: 10.1016/s0248-4900 (00)01103-5. PMID: 11229603.
 66. Force A., Viallard J.-L., Saez F., Grizard G., Boucher D. Electrophoretic characterization of the human sperm-specific enolase at different stages of maturation. *J Androl.* 2004; 25 (5): 824–829. DOI: 10.1002/j.1939-4640.2004.tb02861.x. PMID: 15292116.
 67. Force A., Viallard J.-L., Grizard G., Boucher D. Enolase isoforms activities in spermatozoa from men with normospermia and abnormospermia. *J Androl.* 2002; 23 (2): 202–210. PMID: 11868813.
 68. Isgrò M.A., Bottoni P., Scatena R. Neuron-specific enolase as a biomarker: biochemical and clinical aspects. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 867: 125–143. DOI: 10.1007/978-94-017-7215-0_9. PMID: 26530364.
 69. Pancholi V. Multifunctional α -enolase: its role in diseases. *CMLS, Cell Mol Life Sci.* 2001; 58 (7): 902–920. DOI: 10.1007/PL00000910. PMID: 11497239.
 70. Kimura S., Hayano T., Kato K. Properties and application to immunoassay of monoclonal antibodies to neuron-specific gamma gamma enolase. *Biochim Biophys Acta.* 1984; 799 (3): 252–259. DOI: 10.1016/0304-4165 (84)90268-x. PMID: 6375733.
 71. Kato K., Ishiguro Y., Suzuki F., Ito A., Semba R. Distribution of nervous system-specific forms of enolase in peripheral tissues. *Brain Res.* 1982; 237 (2): 441–448. DOI: 10.1016/0006-8993 (82)90455-3. PMID: 7044473.
 72. Sterk M., Oenings A., Eymann E., Roos W. Development of a new automated enzyme immunoassay for the determination of neuron-specific enolase. *Anticancer Res.* 1999; 19 (4A): 2759–2762. PMID: 10470236.
 73. Mair J. Progress in myocardial damage detection: new biochemical markers for clinicians. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1997; 34 (1): 1–66. DOI: 10.3109/10408369709038215. PMID: 9055056.
 74. Kawata K., Liu C.Y., Merkel S.E., Ramirez S.H., Tierney R.T., Langford D. Blood biomarkers for brain injury: what are we measuring? *Neurosci Biobehav Rev.* 2016; 68: 460–473. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2016.05.009. PMID: 27181909.
 75. Lissner Östlund E., Levin H., Nielsen N., Frigyesi A., Lybeck A. Neuron-specific enolase and long-term neurological outcome after OHCA — a validation study. *Resuscitation.* 2021; 168: 206–213. DOI: 10.1016/j.resuscitation.2021.09.001. PMID: 34508799.
 76. Nyholm B., Grand J., Obling L.E.R., Hassager C., Møller J.E., Schmidt H., Othman M.H., et al. Quantitative pupillometry for neuroprognostication in comatose post-cardiac arrest patients: a protocol for a predefined sub-study of the Blood pressure and Oxygenations Targets after Out-of-Hospital Cardiac Arrest (BOX)-trial. *Resusc Plus.* 2023; 16100475. DOI: 10.1016/j.resplu.2023.100475. PMID: 37779885.
 77. Ferraro S., Braga F., Luksch R., Terenziani M., Caruso S., Panteghini M. Measurement of serum neuron-specific enolase in neuroblastoma: is there a clinical role? *Clin Chem.* 2020; 66 (5): 667–675. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa073. PMID: 32353141.
 78. Bersani I., Pluchinotta F., Dotta A., Savarese I., Campi E., Auriti C., Chuklantseva N., et al. Early predictors of perinatal brain damage: the role of neurobiomarkers. *Clin Chem Lab Med.* 2020; 58 (4): 471–486. DOI: 10.1515/cclm-2019-0725. PMID: 31851609.
 79. Dobrut A., Brzozowska E., Górka S., Pyclik M., Gamian A., Bulanda M., Majewska E., et al. Epitopes of immunoreactive proteins of Streptococcus Agalactiae: enolase, inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and molecular chaperone GroEL. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018; 8: 349. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00349. PMID: 30333963.
 80. Ramirez-Celis A., Edmiston E., Schauer J., Vu T., Van de Water J. Peptides of neuron specific enolase as potential ASD biomarkers: from discovery to epitope mapping. *Brain Behav Immun.* 2020; 84: 200–208. DOI: 10.1016/j.bbi.2019.12.002. PMID: 31812776.
 81. Montaner J., Ramiro L., Simats A., Tiedt S., Makris K., Jickling G.C., Debette S. et al. Multilevel omics for the discovery of biomarkers and therapeutic targets for stroke. *Nat Rev Neurol.* 2020; 16 (5): 247–264. DOI: 10.1038/s41582-020-0350-6. PMID: 32322099.
 82. Горяйнова О.С., Хан Е.О., Иванова Т.И., Тиллиб С.В. Новый метод, базирующийся на использовании иммобилизованных одномоментных антител для удаления определенных мажорных белков из плазмы крови, способствует уменьшению неспецифического сигнала

- в иммуноанализе. *Медицинская иммунология*. 2019; 21 (3): 567–575. Goryainova O.S., Khan E.O., Ivanova T.I., Tillib S.V. A new method based on the use of immobilized single-domain antibodies to remove certain major proteins from blood plasma helps to reduce nonspecific signal in an immunoassay. *Med. Immunol. = Meditsinskaya Immunologiya*. 2019; 21 (3): 567–575. (in Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-567-575.
83. Carney D., Ihde D., Cohen M., Marangos P., Bunn P., Minna J., Gazdar A. Serum neuron-specific enolase: a marker for disease extent and response to therapy of small-cell lung cancer. *Lancet*. 1982; 1 (8272): 583–585. DOI: 10.1016/S0140-6736(82)91748-2. PMID: 6121182.
 84. Marangos P.J., Campbell I.C., Schmechel D.E., Murphy D.L., Goodwin F.K. Blood platelets contain a neuron-specific enolase subunit. *J Neurochem*. 1980; 34 (5): 1254–1258. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1980.tb09967.x. PMID: 7373305.
 85. Genet S.A.A.M., Wolfs J.R.E., Vu C.B.A.K., Wolter M., Broeren M.A.C., Van Dongen J., et al. Analysis of Neuron-Specific enolase isozymes in human serum using immunoaffinity purification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantification. *J Chromatog B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2023; 1223: 123701. DOI: 10.1016/j.jchromb.2023.123701. PMID: 37086508.
 86. Torsetnes S.B., Lønbak S.G., Claus C., Lund H., Nordlund M.S., Paus E., Halvorsen T.G., et al. Immunocapture and LC-MS/MS for selective quantification and differentiation of the isozymes of the biomarker neuron-specific enolase in serum. *J Chromatog B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013; 929: 125–132. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.04.010. PMID: 23669612.
 87. Marangos P.J., Schmechel D.E. Neuron specific enolase, a clinically useful marker for neurons and neuroendocrine cells. *Annu Rev Neurosci*. 1987; 10: 269–295. DOI: 10.1146/annurev.ne.10.030187.001413. PMID: 3551759.

Поступила 15.02.2024
 Принята 17.04.2024
 Принята в печать 29.05.2024