

МЕДИКО – БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 575.17

РОЛЬ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ В ПРОГРЕССИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА

THE ROLE OF CANDIDATE GENES IN THE PROGRESSION CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS

**О.Н. Новакова, Е.В. Некипелова, Т.И. Якунченко, Н.И. Жернакова,
М.И. Чурносков**
**O.N. Novakova, E.V. Nekipelova, T.I. Yakunchenko, N.I. Zhernakova,
M.I. Churnosov**

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет
Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85*

*Belgorod National Research University
Russia, 308015, Belgorod, Pobedy St., 85*

E-mail: litovkina@bsu.edu.ru

Аннотация. В статье изложены данные о роли генов-кандидатов (-1166A/C AT1R1, -6A/G AGT, G460W ADD1, +46G/A ADRB2, K198N ET-1, +6986G/A CYP3A5, C-703T IL-5, VNTR IL-1Ra) в прогрессировании хронического гломерулонефрита. Исследование выполнено на материале двух выборок: 238 больных хроническим гломерулонефритом и 304 человека контрольной группы. Выявлен молекулярно-генетический маркер развития терминальной стадии хронической почечной недостаточности при хроническом гломерулонефрите (генотип -703CC IL-5; OR=1.97, p=0.05). Установлено, что генотипы -1166AC и -1166CC AT1R1 (p=0.008), 198KK и 198KN ET-1 (p=0.05), 2R/5R и 4R/5R IL-1Ra (p=0.05) ассоциированы со снижением почечной выживаемости больных хроническим гломерулонефритом.

Resume. The article presents data on the role of candidate genes (-1166A/C AT1R1, -6A/G AGT, G460W ADD1, +46G/A ADRB2, K198N ET-1, +6986G/A CYP3A5, C-703T IL-5, VNTR IL-1Ra) in the progression of chronic glomerulonephritis. The study was performed on the material of the two samples: 238 patients with chronic glomerulonephritis and 304 people in the control group. Identified molecular genetic marker development of end-stage chronic renal insufficiency in chronic glomerulonephritis (genotype -703CC IL-5; OR=1.97, p=0.05). It was found that the genotypes -1166AC and -1166CC AT1R1 (p=0.008), 198KK and 198KN ET-1 (p=0.05), 2R/5R and 4R/5R IL-1Ra (p=0.05) were associated with reduced renal survival in patients with chronic glomerulonephritis.

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, кандидатные гены, терминальная стадия хронической почечной недостаточности, почечная выживаемость.

Keywords: chronic glomerulonephritis, candidate genes, end-stage chronic renal failure, renal survival.

Введение

Хронический гломерулонефрит (ХГН) относится к наиболее частым почечным заболеваниям, которые заканчиваются смертью больных вследствие развития почечной недостаточности [Зяблицев и др., 2012; Litovkina et al., 2014]. Несмотря на относительно невысокую распространенность хронического гломерулонефрита в популяции, прогрессирующее течение заболевания является причиной того, что больные ХГН составляют основной контингент отделений нефрологии, гемодиализа и трансплантации почки [Осипова и др., 2012].

При анализе эпидемиологических данных по ХГН в России за 2000–2010 гг. выявлена тенденция к росту распространенности хронического гломерулонефрита [Бикбов и др., 2009; Ведерникова и др., 2010; Осипова и др., 2012]. Так число больных ХГН за подотчетный период выросло с 6.7 случая на 10 тыс. населения в 2000 г. до 15.8 – в 2010 г., а число вновь заболевших ХГН составило 9.9–14.9%. Следует отметить, что среди всех хронических болезней почек на додиализной стадии ХГН занимает 2-е место как причина терминальной стадии хронической почечной недостаточности (ТХПН), что по оценке отделений гемодиализа составило около 24% [Осипова и др., 2012]. По

мере снижения почечной функции доля больных хроническим гломерулонефритом в структуре почечных патологий увеличивается. По данным обращаемости мужчины страдают чаще хроническим гломерулонефритом чем женщины (1.4:1) [Бикбов, 2009; Ведерникова и др., 2010].

Поэтому основной задачей современной медицины и нефрологии является изучение не только этиологии и патогенеза ХГН, но и разработка эффективных методов профилактики и лечения, которые позволят определять характер дальнейшего течения и прогрессирования заболевания, уменьшить число летальных случаев. Следует отметить и значительную роль в решении данной задачи изучение эндогенных/генетических факторов, приводящих к болезни [Дудник и др., 2012; Зяблицев и др., 2012]. Особый интерес в генетике мультифакториальных заболеваний в настоящее время имеет подход, основанный на определении полиморфных маркеров генов-кандидатов [Litovkina et al., 2014]. В нефрологии в качестве кандидатных генов преимущественно рассматриваются гены ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, системы синтеза эндотелием, а также гены интегральных мембранных белков, факторов некроза опухоли, интерлейкинов [Lovati et al., 2001; Buraczynska et al., 2006; Юшина и др., 2008; Чурносков и др., 2010; Литовкина и др., 2011; Litovkina et al., 2014b].

Цель

Цель исследования – выявить взаимосвязи полиморфных маркеров генов-кандидатов -1166A/C AT1R1, -6A/G AGT, G460W ADD1, +46G/A ADRB2, K198N ET-1, +6986G/A CYP3A5, C-703T IL-5 и VNTR IL-1Ra со скоростью прогрессирования хронического гломерулонефрита.

Объекты и методы исследования

Выборка больных ХГН, состоящая из 238 человек, формировалась на базе отделения нефрологии ОГБУЗ Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа. Контрольная группа включила 304 человека из уроженцев Центрального Черноземья. Из группы больных исключались лица с гипертонической болезнью, а также те, которые имели сахарный диабет в анамнезе или выявленный при обследовании. В качестве материала для исследования служила венозная кровь в объеме 8-9 мл, взятая из локтевой вены пробанда. Выделение геномной ДНК из периферической крови проведено стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [Miller, 1988]. Анализ исследуемых локусов осуществлялся методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК с использованием олигонуклеотидных праймеров и зондов.

Генотипирование ДНК-маркеров производили следующими методами: анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (-1166A/C AT1R1, -6A/G AGT, C-703T IL-5, VNTR IL-1Ra), анализ дискриминации аллелей методом Tag Map зондов (G460W ADD1, +46G/A ADRB2, K198N ET-1, +6986G/A CYP3A5).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программных пакетов «STATISTICA for Windows 6.0» и «Microsoft Excel 2007».

Результаты и их обсуждение

В работе были изучены следующие полиморфизмы восьми кандидатных генов: ангиотензиногена (-6A/G AGT), α -аддуцина (G460W ADD1), β 2-адренорецептора (+46G/A ADRB2), эндотелина-1 (K198N ET-1), цитохрома 3A5 (+6986G/A CYP3A5), интерлейкина 5 (C-703T IL-5), антагониста рецептора интерлейкина 1 (VNTR IL-1Ra).

Исследование проводилось на двух выборках. В первой группе больных ХГН (n=71), достигших терминальной стадии почечной недостаточности (ТХПН), оценивали распределение генотипов и аллелей полиморфных маркеров генов-кандидатов по сравнению с контрольной группой.

Вторая группа включала 138 больных ХГН без ТХПН, среди них ХПН была выявлена у 34 пациентов. В данной группе был проведен анализ почечной выживаемости с помощью метода множительных оценок Каплана-Мейера [Боровиков, 2003].

Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов-кандидатов у больных ХГН с ТХПН и в контроле выявил следующую особенность (см таблицу). Достоверные данные получены только по полиморфизму C-703T IL-5. Частота генотипа -703CC гена IL-5 у больных в терминальной стадии ХПН достоверно превышала частоту этого генотипа в контрольной группе (64.15% и 49.7% соответственно) (см. таблицу). Таким образом, можем отметить, что генотип -703CC является маркером развития терминальной стадии хронической почечной недостаточности при ХГН (OR=1.97; $\chi^2=3.88$, p=0.05).

Таблица
Table.

Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров кандидатных генов у больных ХГН с ТХПН и в контрольной группе
Comparative analysis of the frequencies of alleles and genotypes of polymorphic markers of candidate genes in CGN patients with end-stage renal failure in the control group

Локусы	Аллели, генотипы	Больные ХГН с ТХПН (n=71) %	Контрольная группа (n=304) %	OR (95% CI) χ^2 ; p
1	2	3	4	5
G/A GNB3	G	69.01	68.32	1.03 (0.68-1.56)
	A	30.99	31.68	$\chi^2=0.00$; p=0.95
	GG	46.48	45.88	1.03 (0.59-1.78)
	GA	45.07	44.88	$\chi^2=0.00$; p=1.00
	AA	8.45	9.24	1.01 (0.58-1.75)
G460W ADD1	460W	16.43	15.13	0.91 (0.54-1.54)
	460G	83.57	84.87	$\chi^2=0.06$; p=0.80
	460WW	7.14	3.29	2.26 (0.65-7.51)
	460GW	18.57	23.68	$\chi^2=1.31$; p=0.25
	460GG	74.29	73.03	0.74 (0.36-1.48)
				$\chi^2=0.58$; p=0.45
+46G/A ADRB2	+46G	61.27	60.07	1.07(0.60-2.02)
	+46A	38.73	39.93	$\chi^2=0.00$; p=0.95
	+46GG	35.21	37.62	1.05 (0.71-1.56)
	+46GA	52.11	44.88	$\chi^2=0.03$; p=0.87
	+46AA	12.68	17.50	0.90 (0.51-1.60)
K198N ET-1	198K	84.29	81.46	$\chi^2=0.06$; p=0.81
	198N	15.71	18.54	0.90 (0.51-1.60)
	198KK	70.00	66.89	1.34 (0.77-2.32)
	198KN	28.57	29.14	$\chi^2=0.94$; p=0.33
	198 NN	1.43	3.97	0.69 (0.30-1.53)
-6A/G AGT	-6A	53.52	52.31	$\chi^2=0.65$; p=0.42
	-6G	46.48	47.69	1.22 (0.72-2.08)
	-6AA	30.99	30.36	$\chi^2=0.44$; p=0.51
	-6AG	45.07	43.89	1.16 (0.64-2.11)
	-6GG	23.94	25.75	$\chi^2=0.13$; p=0.72
-1166A/C AT1R1	-1166A	72.79	74.01	0.97 (0.53-1.79)
	-1166C	27.21	25.99	$\chi^2=0.00$; p=1.00
	-1166AA	55.88	55.26	0.35 (0.02-2.66)
	-1166AC	33.82	37.50	$\chi^2=0.47$; p=0.49
	-1166CC	10.30	7.24	1.05 (0.72-1.54)
C-703T IL-5	-703C	81.13	71.52	$\chi^2=0.02$; p=0.87
	-703T	18.87	28.48	1.03 (0.57-1.86)
	-703CC	64.15*	49.72	$\chi^2=0.00$; p=1.00
	-703CT	33.96	43.64	1.05 (0.60-1.82)
	-703TT	1.89	6.64	$\chi^2=0.00$; p=0.96
VNTR IL-1Ra	2R/2R	6.67	4.6	0.91 (0.48-1.72)
	2R/4R	25.0	33.33	$\chi^2=0.03$; p=0.87
	2R/5R	3.33	1.75	0.94 (0.61-1.46)
	4R/4R	60.0	59.06	$\chi^2=0.03$; p=0.85
	4R/5R	5.00	2.34	1.03 (0.59-1.80)

Примечание: *- различия достоверны между больными и контрольной группой (p<0.05).

При оценке почечной выживаемости у больных ХГН в зависимости от изучаемых генетических полиморфизмов, проведенной с использованием метода множительных оценок Каплана-Майера [Боровиков, 2003], найдены статистически значимые взаимосвязи со скоростью прогрессирования заболевания по трем из восьми рассматриваемых генетических полиморфизмов +46G/A ADRB2, K198N ET-1 и VNTR IL-1Ra:

- 1) 198KK и 198KN ET-1 ($p=0.05$) (рис. 1).
- 2) 2R/5R, 4R/5R IL-1Ra ($p=0.05$) (рис. 2).
- 3) -1166AC и -1166CC AT1R1 ($p=0.008$) (рис. 3).

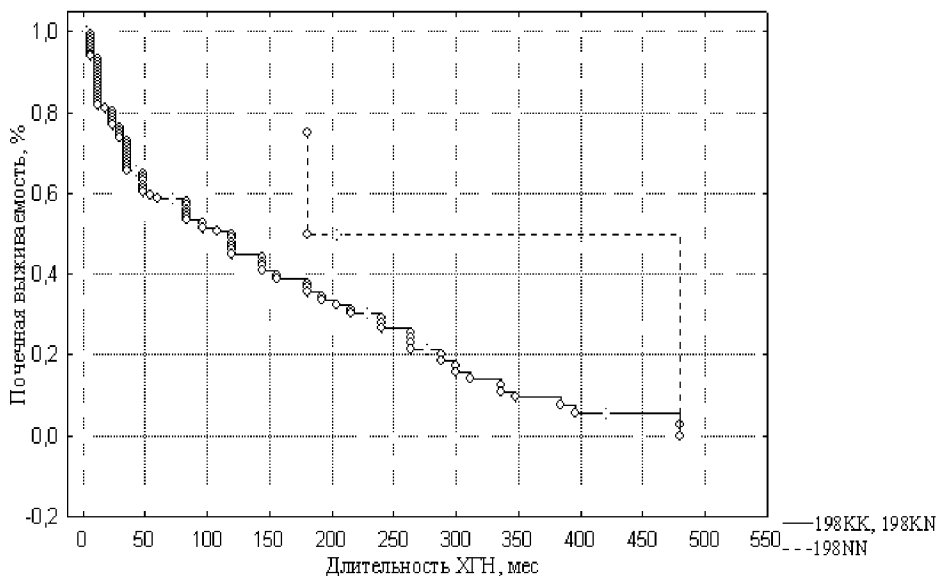


Рис. 1. Почечная выживаемость у больных ХГН в зависимости от генотипов полиморфного маркера K198N ET1K198N

Fig. 1. Renal survival in patients with CGN, depending on the genotype polymorphic marker K198N ET1K198N

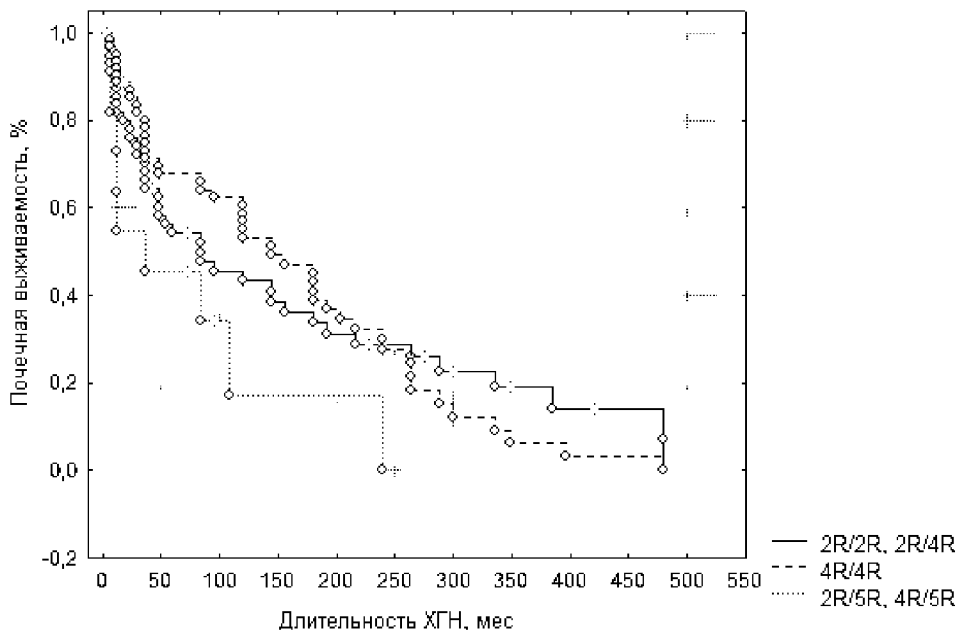


Рис. 2. Почечная выживаемость у больных ХГН в зависимости от генотипов полиморфного маркера VNTR IL-1Ra

Fig. 2. Renal survival in patients with CGN, depending on the genotype polymorphic marker VNTR IL-1Ra

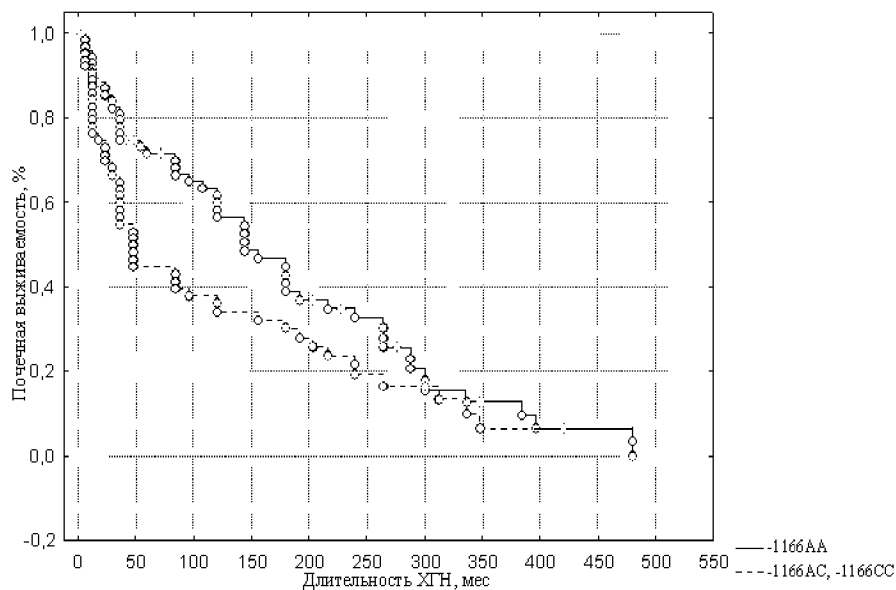


Рис. 3. Почечная выживаемость у больных ХГН в зависимости от генотипов полиморфного маркера -1166A/C AT1R1

Fig. 3. Renal survival in patients with CGN, depending on the genotype polymorphic marker -1166A/C AT1R1

Таким образом, генотипы -1166AC и -1166CC AT1R1, 198KK и 198KN ET-1, 2R/5R и 4R/5R IL-1Ra можно считать неблагоприятными факторами почечной выживаемости у больных ХГН.

Vugaczynska M. и др. [2006] получили аналогичные результаты по полиморфизму -1166A/C AT1R1 при изучении генов ренин-ангиотензиновой системы у больных хроническим гломеруло-нефритом. У лиц с генотипами -1166AC и -1166CC, среднее время развития заболевания до ТХПН было значительно меньше, чем у пациентов с генотипом -1166AA локуса AT1R1. В некоторых работах [Шарнова и др., 2006] показано, что полиморфизм -1166A/C AT1R1 является фактором риска развития ХПН в исходе нефротического синдрома у детей.

Резюмируя полученные результаты, следует отметить:

1) Неблагоприятными факторами почечной выживаемости у больных ХГН следует считать следующие молекулярно-генетические маркеры -1166AC и -1166CC AT1R1, 198KK и 198KN ET-1, 2R/5R, 4R/5R IL-1Ra.

2) Маркером развития терминальной стадии хронической почечной недостаточности при хроническом гломеруло-нефрите является генотип -703CC гена IL-5.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания №2014/511 «Изучение генетических факторов риска развития мультифакториальных заболеваний человека».

Список литературы References

- Бикбов Б.Т., Томилина Н.А. 2009. Состояние заместительной почечной терапии больных с хронической почечной недостаточностью в Российской Федерации в 1998–2007 гг. *Нефрология и диализ*. 1(3): 144–219.
- Bikbov B.T., Tomilina N.A. 2009. Sostojanie zamestitel'noj pochechnoj terapii bol'nyh s hronicheskoj pochechnoj nedostatochnost'ju v Rossijskoj Federacii v 1998–2007 gg. [Status of renal replacement therapy in patients with chronic renal failure in the Russian Federation in 1998–2007] *Nefrologija i dializ*. 1(3): 144–219. (in Russian)
- Боровиков В. 2003. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. Спб., Питер, 502.
- Borovikov V. 2003. *Statistica. Iskusstvo analiza dannyh na komp'yutere* [Statistica. Art on a computer analysis of the data]. Spb., Piter. 502. (in Russian)
- Ведерникова С.Л., Сайгак Н.В., Алехнович А.В. 2010. Распространенность и структура заболеваний почек у пациентов по данным амбулаторно-поликлинического приема. *Нефрология и диализ*. 12(2): 111–114.
- Vedernikova S.L., Sajgak N.V., Alehnovich A.V. 2010. Rasprostranennost' i struktura zabolevanij pochek u pacientov po dannym ambulatorno- poliklinicheskogo priema [Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system in end-stage renal disease]. *Nefrologija i dializ*. 12(2): 111–114. (in Russian)

- Дудник В.М., Звенигородская А.Ю. 2012. Оценка нарушений гемопоэза и состояния функции почек у детей с хроническим гломерулонефритом в зависимости от аллельного полиморфизма генов интерлейкинов-10 и -1b. *Здоровье ребенка*. 3: 18–21.
- Dudnik V.M., Zvenigorodskaja A.Ju. 2012. Ocenka narushenij gemopojeza i sostojanija funkicii pochetk u detej s hronicheskim glomerulonefritom v zavisimosti ot allelnogo polimorfizma genov interlejkinov-10 i -1b [Evaluation of hematopoietic disorders, and renal function in children with chronic glomerulonephritis, depending on the allelic polymorphism of interleukin-10 and -1b]. *Zdorov'e rebenka*. 3: 18–21. (in Russian)
- Зяблицев С.В., Чернобривцев П.А., Кипеня М.С., Пищулина С.В. 2012. Роль генетического маркера эндотелиальной дисфункции гена ACE в патогенезе гломерулонефрита. *Таврический медико-биологический вестник*. 15(3): 105–108.
- Zjablicev S.V., Chernobrivcev P.A., Kishenja M.S., Pishhulina S.V. 2012. Rol' geneticheskogo markera jendotelial'noj disfunkcii gena ACE v patogeneze glomerulonefrita [The role of the genetic marker of endothelial dysfunction ACE gene in the pathogenesis of glomerulonephritis]. *Tavrisheskij mediko-biologicheskij vestnik*. 15(3): 105–108. (in Russian)
- Литовкина О.Н., Некипелова Е.В., Крикун Е.Н., Полякова И.С., Чурносос М.И. 2011. Изучение популяционно-генетических характеристик генов кандидатов среди больных хроническим гломерулонефритом. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 4(13): 146–152.
- Litovkina O.N., Nekipelova E.V., Krikun E.N., Polyakova I.S., Churnosov M.I. 2011. Izuchenie populjacionno-geneticheskikh harakteristik genov kandidatov sredi bol'nyh hronicheskim glomerulonefritom [The study population genetic characteristics of the candidate genes in patients with chronic glomerulonephritis]. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Medicina. Farmacija*. 4(13): 146–152. (in Russian)
- Рябова О.Ю. 2006. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ. STATISTICA. М., Медиафера. 305.
- Rebrova O.Ju. 2006. Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh programm [Statistical analysis of medical data. The application package STATISTICA applications] STATISTICA. М., Mediasfera. 305. (in Russian)
- Сигитова О.Н., Архипов Е.В. 2012. Эпидемиология хронического гломерулонефрита у взрослого населения. *Вестник современной клинической медицины*. 5(4): 19–22.
- Sigitova O.N., Arhipov E.V. 2012. Jepidemiologija hronicheskogo glomerulonefrita u vzroslogo naselenija [Epidemiology of chronic glomerulonephritis in adults]. *Vestnik sovremennoj klinicheskoy mediciny*. 5(4): 19–22. (in Russian)
- Чурносос М.И., Калмыкова Е.В., Некипелова Е.В., Рудых Н.А., Аристова И.К., Должиков А.А. 2010. Аллельные варианты генов интерлейкинов при хроническом гломерулонефрите. *Цитокины и воспаление*. 9(2): 37–41.
- Churnosov M.I., Kalmykova E.V., Nekipelova E.V., Rudykh N.A., Aristova I.K., Dolzhikov A.A. 2010. Allel'nye varianty genov interlejkinov pri hronicheskom glomerulonefrite. [The allelic variants of genes interleukins in chronic glomerulonephritis]. *Citokiny i vospalenie*. 9(2): 37–41. (in Russian)
- Шарнова Ж.П., Цыгин А.Н., Тихомиров Е.Е. 2006. Полиморфизм генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы при нефротическом синдроме у детей. *Обзор литературы. Нефрология и диализ*. 8 (3): 216–224.
- Sharnova Zh.P., Cygin A.N., Tihomirov E.E. 2006. Polimorfizm genov renin-angiotenzin-al'dosteronovoj sistemy pri nefroticheskom sindrome u detej [Polymorphism of genes of the renin-angiotensin-aldosterone system in the nephrotic syndrome in children]. *Obzor literatury. Nefrologija i dializ*. 8 (3): 216–224. (in Russian)
- Юпина И.А., Калмыкова Е.В., Некипелова Е.В., Чурносос М.И. 2008. Оценка роли генетических и иммунологических факторов в формировании хронической почечной недостаточности на фоне хронического гломерулонефрита. *Курский научно-практический вестник. «Человек и его здоровье»*. 2: 117–125.
- Jushina I.A., Kalmykova E.V., Nekipelova E.V., Churnosov M.I. 2008. Ocenka roli geneticheskikh i immunologicheskikh faktorov v formirovanii hronicheskoy pochechnoj nedostatochnosti na fone hronicheskogo glomerulonefrita. [Assessment of the role of genetic and immunological factors in the formation of chronic renal insufficiency on the background of chronic glomerulonephritis]. *Kurskij nauchno-prakticheskij vestnik «Chelovek i ego zdorov'e»*. 2: 117–125. (in Russian)
- Buraczynska M., Ksiazek P., Drop A., Zaluska W., Spasiewicz D., Ksiazek A. 2006. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system in end-stage renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 21 (4). 979–983.
- Litovkina O., Nekipelova E., Dvornyk V. et al. 2014a. Genes involved in the regulation of vascular homeostasis determine renal survival rate in patients with chronic glomerulonephritis. *Gene*. 546(1): 112–116.
- Litovkina O.N., Nekipelova E.V., Sirotina S.S., Yakunchenko T.I., Efremova O.A., Sorokina I.N. 2014b. Polymorphism of Vascular Homeostasis Genes and Progression of Chronic Kidney Disease in Patients with Chronic Glomerulonephritis. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical*. 5(5): 1079–1082.
- Lovati E., Richard A., Frey B.M., Frey F.J., Ferrari P. 2001. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system in end-stage renal disease. *Kidney Int*. 60(1): 46–54.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 16(3): 1215–1221.