

УДК 616.611-002-018.74-097;575.1

© Коллектив авторов, 2012.

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАРКЕРА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ГЕНА ACE В ПАТОГЕНЕЗЕ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА

С.В. Зяблицев, П.А. Чернобривцев, М.С. Кишеня, С.В. Пищулина

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, центральная научно-исследовательская лаборатория (зав. – д.мед.н., проф. В.Я. Уманский), г. Донецк.

THE ROLE OF GENETIC MARKER OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION GENE ACE IN GLOMERULONEPHRITIS PATHOGENESIS

S.V. Ziablitsev, P.A. Chernobrivtsev, M.S. Kishenya, S.V. Pischulina

SUMMARY

The interrelationship between clinical duration of chronic glomerulonephritis and I/D gene polymorphism of angiotensin converting enzyme was detected. High level of proteinuria, decreased glomerular filtration rate and progressive renal insufficiency was observed at DD-variant of genotype.

РОЛЬ ГЕНЕТИЧНОГО МАРКЕРА ЭНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ ГЕНУ ACE В ПАТОГЕНЕЗІ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТУ

С.В. Зябліцев, П.А. Чернобривцев, М.С. Кишеня, С.В. Піщуліна

РЕЗЮМЕ

Виявлено взаємозв'язок між клінічними особливостями хронічного гломерулонефриту й I/D поліморфізмом гена ACE. При DD-варіанті генотипу були відмічені високий ступінь протеїнурії, зниження швидкості клубочкової фільтрації, прогресування ниркової недостатності.

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, эндотелиальная дисфункция, I/D полиморфизм гена ангиотензин-превращающего фермента.

Хронический гломерулонефрит (ГН) принадлежит к наиболее частым заболеваниям почек, которое заканчивается смертью больных вследствие развития почечной недостаточности [6, 7]. Распространенность его в Украине составляет 81 случай на 100 тыс. взрослого населения [4], что определяет дальнейшее изучение патогенеза заболевания одним из актуальных направлений современной медицины [2]. В развитии нефрологии на современном этапе одним из ведущих направлений является молекулярно-генетическое изучение эндогенных/генетических факторов, приводящих к болезни.

Для изучения роли наследственных факторов в развитии полигенных заболеваний часто используется подход, основанный на определении полиморфных маркеров генов-кандидатов [3]. В качестве генов-кандидатов продукты, экспрессии которых могут определять скорость прогрессирования почечной недостаточности, рассматривают в первую очередь гены, кодирующие компоненты ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. Регулируя системную и внутрипочечную гемодинамику, а также стимулируя гипертрофию и гиперплазию мезангиальных клеток и синтез межклеточного матрикса, продукты экспрессии этих генов участвуют в развитии ГН и нефросклероза [3, 5, 7].

Ген ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) – ACE, размер которого 22 т. п. н., картирован на 17 (17q23) хромосоме и состоит из 26 экзонов и 25

интронов [5,9]. В 16-м интроне был выявлен инсерционно-делеционный полиморфизм, связанный с инсерцией (I) или делецией (D) Alu-повтора размером 287 п. н. [5,8,10]. Наличие D-аллеля ассоциировано с более высоким уровнем циркулирующего (от 14 до 50 %) и тканевого АПФ [11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находились 59 больных мезангиальным ГН (25 мужчин и 24 женщины) в возрасте от 16 до 67 лет. Продолжительность манифестации заболевания составляла от 2 до 14 лет. У 28,6 % пациентов диагностирован нефротический синдром, у 34,7 % констатирована систолическая артериальная гипертензия (>140 мм рт.ст.), у 32,7 % – диастолическая (>90 мм рт.ст.). Больные находились в I-III стадиях хронической почечной недостаточности (величины скорости клубочковой фильтрации (СКФ) составили от 26,31 мл/мин до 124,17 мл/мин). Всем больным была выполнена пункционная нефробиопсия. В 77,8 % случаях установлен хронический мезангиопролиферативный ГН, у 22,2 % – мезангиокапиллярный ГН. Контрольную группу составили 30 практически здоровых людей (12 мужчин и 18 женщин) в возрасте от 18 до 60 лет без заболеваний почек и артериальной гипертензии.

ДНК-диагностику проводили в отделе молекулярно-генетических исследований ЦНИЛ ДонНМУ им. М. Горького. ДНК выделяли из

лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь». Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли с помощью тест-системы «SNP-экспресс: инсерционно-делеционный полиморфизм гена ACE Alu Ins/Del I>D» (НПФ Литех, Россия). ПЦР проводили при следующих условиях: первичная денатурация при 93°C в течение 1 мин, после которой следовали 35 циклов, состоящих из денатурации при 93°C в течение 10 сек, отжига праймеров при 64°C в течение 10 сек, элонгации при 72°C в течение 20 сек. Реакцию выполняли на амплификаторе Gene Amp® PCR System 2400 (Applied Biosystems, США). Анализ амплифицированных фрагментов выполняли путем электрофореза в 3 %-ном агарозном геле, окрашенном в бромистом этидии. Визуализацию результатов проводили в ультрафиолетовом трансиллюминаторе «TFX-20.M» (Vilber Lourmat, Франция). Достоверность различий в частотах аллелей и генотипов между группами оценивали с помощью критерия χ^2 и точного метода Фишера (Fet). Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Рассчитывали отношения шансов (OR) с доверительными интервалами (CI) $\pm 5\%$. Статистическую обработку выполняли с помощью программы статистического анализа StatPlus – 2009 (AnalystSoft Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

В результате исследования полиморфизма гена ACE выявлены I/I, I/D и D/D генотипы в обеих группах

обследованных лиц. При сравнении частот встречаемости аллелей в двух группах, были получены следующие результаты (см. рис. 1). В группе больных ГН частота встречаемости генотипов D/D составляла 57,6 %, I/D – 33,9 % и I/I – 8,5 %. В контрольной группе варианты генотипов распределились таким образом: I/I – 16,7 %, I/D – 53,3 %, D/D – 30,0 %. При анализе частот распределения аллелей гена ACE выявлено, что неблагоприятный вариант генотипа D/D встречался почти в 2 раза чаще у больных с ГН в сравнении с контрольной группой исследуемых лиц ($p < 0,05$).

Сравнительный анализ с использованием точного критерия Фишера не выявил достоверных различий в распределении генотипа I/I гена ACE между контрольной группой и группой больных с ГН ($p = 0,14$). Полученные данные свидетельствовали об отсутствии ассоциации полиморфизма I/I гена ACE с развитием ГН. В тоже время была установлена достоверная ассоциация наличия генотипов I/D и D/D с ГН ($p = 0,039$ и $p = 0,009$, соответственно).

При этом носительство генотипа D/D (OR=3,17) (доверительный интервал CI=1,244-8,093) предрасполагало к развитию заболевания, тогда как носительство генотипа I/I (OR=0,46; CI=0,123-1,746) и I/D (OR=0,45; CI=0,183-1,101), напротив коррелировало с пониженным риском развития патологии почек.

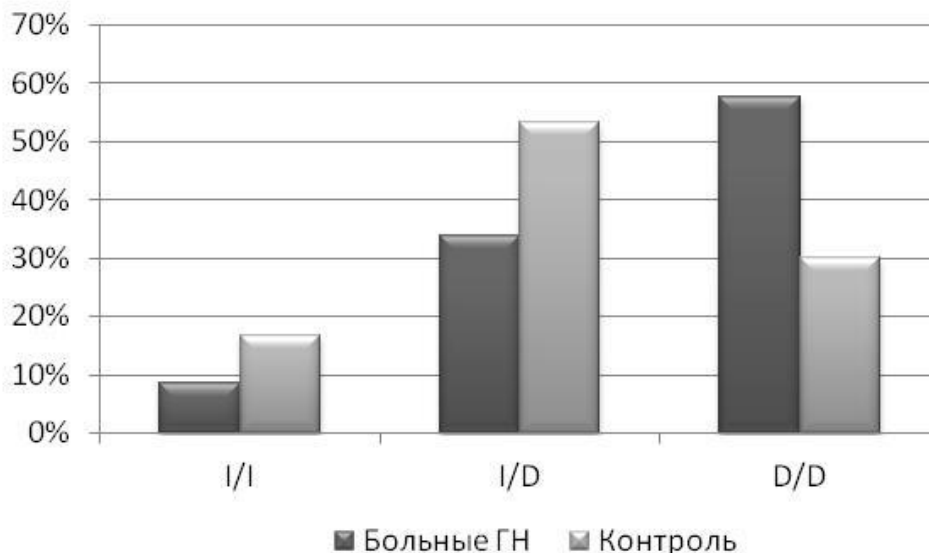


Рис.1. Сравнение частот встречаемости аллелей гена ACE в двух группах.

Была изучена связь полиморфизма гена ACE с выраженностью протеинурии, СКФ, показателями АД у пациентов с ГН. Результаты дисперсионного анализа представлены в табл.2. При этом статистически достоверные различия были получены в оценке степени протеинурии и СКФ ($p < 0,001$), подтвердившие положение о том, что пациенты с генотипом D/D имели высокие значения

протеинурии ($> 3,9$ г/сут) и значительное снижение СКФ, что указывало на быстрое прогрессирование ХПН вплоть до развития терминальной стадии недостаточности почек. Вместе с тем группа больных с генотипом I/I характеризовалась невысокой протеинурией ($< 1,9$ г/сут) и незначительным снижением СКФ.

Таблица 1
Анализ ассоциаций генотипов гена ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ) и развития гломерулонефрита

Генотипы	Больные ГН (n=59)		Контроль (n=30)		p(Fet)	OR	CI (±5%)	χ^2	p (χ^2)
	n	%	n	%					
I/I	5	8,5	5	16,7	0,140	0,463	0,123-1,746	6,19	0,047
I/D	20	33,9	16	53,3	0,039	0,449	0,183-1,101		
D/D	34	57,6	9	30,0	0,009	3,173	1,244-8,093		

Таблица 2
Влияние генотипа АСЕ на показателей функции почек у пациентов с гломерулонефритом

Показатели	Генотип			p(F)
	I/I (n=6)	I/D (n=21)	D/D (n=32)	
СКФ, (мл/мин)	118,59±4,96	69,22±1,89	31,23±1,01	< 0,001
Протеинурия, (г/сут)	1,09±0,08	2,16±0,03	5,26±0,15	< 0,001
АД систолическое, (мм рт. ст.)	131,86±4,56	140,34±5,26	149,06±3,03	0,130
АД диастолическое (мм рт. ст.)	73,14±6,72	81,00±3,91	90,71±2,88	0,069

Не была обнаружена статистическая достоверность между распределением пациентов с генотипами I/I, I/D и D/D и уровнем систолического и диастолического АД. Системная артериальная гипертензия вносит свой вклад в прогрессирование ХПН преимущественно за счет трансмиссии системного артериального давления на почечные капилляры, усугубляя тем самым процессы внутрипочечной гипертонии и гиперфльтрации с их повреждающими воздействиями [1,5,9]. Гидродинамическое повреждение стенки капилляров клубочка вызывает усиление протеинурии; прохождение макромолекул через мезангий, приводят к активации макрофагов и моноцитов, экспрессии широкого спектра цитокинов, активации почечных фибробластов, накопление компонентов внеклеточного матрикса, развитие нефросклероза [1,10].

ВЫВОДЫ

Обнаружено, что генотип D/D гена АСЕ является прогностически неблагоприятным фактором развития ГН, в связи с чем результаты исследования I/D полиморфизма гена АСЕ могут быть использованы в качестве оценочного критерия для выделения групп больных ГН с повышенным риском прогрессирования почечной недостаточности, а также выработки индивидуальных показаний для назначения препаратов, блокирующих АПФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белянская Т. В. Дифференцированный подход к ведению больных хроническим гломерулонефритом с учетом генетической предрасположенности: Автореф. дис... кан-та мед. наук: 14.00.09 – М., 2007. – 20 с.
2. Дудар І.О., Степанова Н.М. Шляхи сповільнення темпів прогресування хронічних захворювань нирок в клінічній практиці та експерименті // Укр.журн.нефрол. та діалізу. – 2004. Т.6, №3. – С.42-50.
3. Калиев Р.Р., Будайчиева А.Б., Алдашев А.А. Взаимосвязь I/D полиморфизма гена ангиотензинпревращающего фермента с прогрессированием хронического гломерулонефрита // Терапевт. архив. – 2005. – Т. 77, № 6. – С.12-15.
4. Колесник М.О., Сайдакова Н.О. Нефрологічна служба в 2003 році: здобутки, проблеми та шляхи їх вирішення // Укр.журн.нефрол. та діалізу. – 2004. Т.6, №1. – С.12-16.
5. Мустафина О.Е., Тхаркахова З.Н., Бикмеева А.М. и соавт. Полиморфизм гена ангиотензин-превращающего фермента и риск мультифакториальных заболеваний // Мед. генетика. – 2002. Т.1, №5. – С.212-220.
6. Пиріг Л.А. Клінічна нефрологія. – Київ: Здоров'я, 2004. – 528 с.
7. Семидоцкая Ж.Д., Перерва Л.А., Яковцова А.Ф. Клинико-морфологические особенности различных форм хронического гломерулонефрита // Врачеб. практика. – 2004. – № 1. – С.66-68.

8. Lee D.Y., Kim W., Kang S.K., Koh G.Y., Park S.K. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in patients with minimal-change nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis // *Nephron*. – 1997. № 77. – P.471–473.

9. McLaughlin K.J.M., Harden P.N., Ueda S., Boulton-Jones J.M. et al. The role of genetic polymorphism of angiotensin-converting enzyme in the progression of renal diseases // *Hypertension*. – 1996. № 28. – P.912–915.

10. Mezzano S., Droguett M.A., Burgos M.E. et al. Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy // *Kidney Int*. – 2000. № 57. – P.147-158.

11. Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F., Cambien F., Corvol P., Soubrier F. An I/D-polymorphism in the ACE-gene accounting for half the variance of serum enzyme levels // *J Clin Invest*. – 1990. № 86. – P.1343–1346.